



Universidade do Minho

Escola de engenharia
Departamento de Engenharia Biológica

António Jandir Pina Gomes

Optimização da Produção de Frutooligossacáridos por *Aspergillus*

Julho de 2009



Universidade do Minho

**Escola de engenharia
Departamento de Engenharia Biológica**

António Jandir Pina Gomes

Optimização da Produção de Frutooligossacáridos por *Aspergillus*

Tese realizada sob a orientação de:

**Doutora Lígia Rodrigues
Doutora Isabel Rocha**

Julho de 2009

“A mente que se abre a uma nova ideia
jamais voltará ao seu tamanho original”

Albert Einstein
(1879-1955)

Aos meus pais, por todo a apoio,
Incentivo, Amor e confiança que sempre
depositaram em mim

Agradecimentos

Gostaria de deixar registado o meu mais sincero agradecimento a todos aqueles que directa ou indirectamente contribuíram para a realização deste trabalho, nomeadamente:

À minha orientadora, Doutora Lúcia Rodrigues, pelo infinito apoio, ensinamentos, compreensão, simpatia, optimismo e pela infinita paciência que sempre teve, por tudo isto e muito mais o meu sincero obrigado.

À minha orientadora, Doutora Isabel Rocha, pelos conhecimentos transmitidos, simpatia e pelo apoio demonstrado.

Ao Doutor Nuno Faria, e a todos os colaboradores da BIOTEMPO pelo acolhimento e partilha de conhecimentos.

Ao Doutor António Peres, pela disponibilidade, simpatia e pelos conhecimentos transmitidos.

À Engenheira Ana Dominguez, por todo o apoio, disponibilidade, simpatia, a tua preciosa colaboração tornou possível a realização deste trabalho, fica aqui registado a minha eterna gratidão.

A todos os que ainda estão ou que passaram pelo Laboratório de Fermentações. Obrigada por todo o apoio, amizade e pelo excelente ambiente de trabalho, que não poderia ser melhor!

Ao Sr. Santos, por toda a ajuda e disponibilidade sempre que precisei.

Aos meus amigos, pela paciência interminável perante alguns momentos de desânimo e pelo apoio constante.

À minha família, por todo o seu incessante apoio e pela paciência que sempre tiveram comigo, principalmente naquelas alturas mais difíceis.

Resumo

Este trabalho foi proposto no âmbito do Projecto BIOLIFE – *Produção de ingredientes para alimentos funcionais*, em curso na BIOTEMPO, Lda desde 2004.

Com este trabalho, pretendeu-se avaliar o potencial da produção de frutooligossacáridos (FOS) por *Aspergillus* sp, recorrendo a um sistema de fermentação descontínuo.

Frutooligossacáridos (FOS) são oligossacáridos que ocorrem naturalmente em produtos de origem vegetal, tais como o tomate, cevada, cebola, banana, centeio, espargos, alcachofras, entre outros. Para além de existirem naturalmente, os FOS podem ser produzidos a partir da sacarose usando enzimas ou recorrendo a microrganismos produtores. A tecnologia de fermentação tem como vantagem face à tecnologia enzimática, actualmente a mais utilizada no mercado, o facto de evitar o passo de produção e separação das enzimas, simplificando o processo e reduzindo os custos de operação.

Os FOS são prebióticos que, para além de serem compostos indigeríveis, possuem um bom poder adoçante que, apesar de inferior ao dos açúcares comuns é bastante significativo. Esta característica permite a sua utilização como adoçantes não calóricos. Adicionalmente, os prebióticos apresentam outras propriedades benéficas tais como o aumento da absorção de cálcio e magnésio, o aumento da velocidade de metabolismo dos lípidos e efeitos anti-cancerígenos.

A produção de FOS por *Aspergillus* sp foi estudada recorrendo a um desenho experimental para restringir o número de experiências requeridas num processo de optimização. Inicialmente foram efectuadas sete fermentações com o intuito de encontrar o ponto óptimo de produção de FOS. Os parâmetros de optimização utilizados foram a temperatura e a agitação. Posteriormente, foram incluídas mais quatro fermentações no referido desenho.

O tratamento estatístico dos resultados conduziu a um modelo cúbico que foi posteriormente validado comprovando o seu ajuste. Concluindo, o desenho experimental permitiu obter um modelo que descreve a produção de FOS por *Aspergillus* sp, bem como determinar as condições para os quais o rendimento de produção de FOS é máximo.

Abstract

This work was developed under the scope of the project BIOLIFE - Production of ingredients for functional foods, in course in the BIOTEMPO, Ltd since 2004.

The aim of this work, was to evaluate the potential of *Aspergillus* sp for the production of fructooligosaccharides (FOS), using a one-step batch fermentation.

Fructooligosaccharides (FOS) are oligosaccharides that occur naturally in products of vegetal origin, such as tomato, barley, onion, banana, rye, asparagus, artichokes, among others. Furthermore, FOS can be produced from sucrose whether using enzymes or FOS-producer microorganisms. Fermentative processes have advantages as compared to enzymatic ones (currently the most used in the market), such as the fact that no production and separation of enzymes steps are required, simplifying the processes and reducing the operational costs.

FOS are prebiotics that, besides being non-digestible compounds, possess a strong sweetness that, although lower than for common sugars, is very significant. This characteristic allows its use as non caloric sweeteners. Additionally, prebiotics present other beneficial properties for the human beings, such as the increase of calcium and magnesium absorption, increase of the lipids metabolism and anti-cancer effects.

The production of FOS by *Aspergillus* sp was studied using a factorial experimental design to restrict the number of experiences required for any optimization process. Initially, seven fermentations were performed in order to find the optimal conditions that maximize FOS production. The parameters of the design include temperature and agitation speed. Afterwards, four extra fermentations were included in the experimental design.

The statistics of the obtained results conducted to a cubical model that was later validated proving its good fitness. Concluding, from the experimental design it was possible to adjust a model that describes FOS production by *Aspergillus* sp, as well as to determine the conditions that yield a maximum FOS production.

Índice

1. Introdução	11
2. Revisão Bibliográfica.....	13
2.1. Alimentos Funcionais	14
2.1.1. Probióticos	15
2.1.2. Prebióticos	16
2.1.3. Simbióticos.....	17
2.2. Frutooligossacáridos	18
2.2.1. Ocorrência e Estrutura.....	18
2.3. Métodos de produção dos Frutooligossacáridos.....	19
2.4. Funções e actividade biológica dos Frutooligossacáridos.....	21
2.5. Mercado e produção industrial de FOS.....	22
2.6. Produção de FOS usando <i>Aspergillus</i>	23
2.6.1. O género <i>Aspergillus</i> e as suas vias metabólicas.....	23
2.7. <i>Aspergillus</i> : preparação de inóculos e crescimento	25
2.8. <i>Aspergillus</i> como produtores de FOS.....	26
2.9. Produção de FOS por via fermentativa usando <i>Aspergillus</i>	26
2.10. Desenho factorial de experiências	27
3. Materiais e Métodos	29
3.2 Método de produção de FOS por fermentação descontínua de sacarose por <i>Aspergillus</i> sp.	31
3.3.1. Reagentes	31
3.3.2. Equipamento.....	32
3.3.3. Preparação dos meios de fermentação	32
3.3.4. Fermentação.....	34
3.5. Método de determinação de biomassa em peso seco no micro-ondas.....	36
3.6. Método para quantificação de sacarídeos por HPLC	36
4. Resultados e Discussão.....	38
4.1. Optimização da produção de FOS por <i>Aspergillus</i> sp	39
4.2. Expansão do desenho experimental	41
4.3. Validação do modelo experimental.....	44
4.4. Fermentações no ponto óptimo	47
5. Conclusões e Recomendações de Trabalho Futuro	49
5.1. Conclusões.....	50
5.2. Recomendações.....	51
6. Bibliografia	52
Anexos	55

Índice de tabelas

Tabela 1	Exemplos de microrganismos descritos como probióticos	16
Tabela 2	Principais benefícios na utilização de FOS	21
Tabela 3	Composição do meio de fermentação	31
Tabela 4	Desenho experimental	35
Tabela 5	Desenho experimental alargado	35
Tabela 6	Tempos de retenção aproximados (min) dos açúcares separados na coluna amina, nas condições descritas	37
Tabela 7	Resultados das fermentações realizadas nas condições do desenho experimental	41
Tabela 8	Resultados das fermentações realizadas nas condições do desenho experimental alargado	42
Tabela 9	Ponto óptimo dos modelos	43
Tabela 10	Teste ANOVA do modelo	44
Tabela 11	Valores dos parâmetros do teste ANOVA do modelo	44
Tabela 12	Resultados das fermentações efectuadas no ponto óptimo	47

Índice de figuras

Figura 1	Estrutura da kestose (A), nistose (B) e fructosil-nistose (C)	19
Figura 2	<i>Aspergillus flavus</i> (A) e <i>Aspergillus fumigatus</i> (B)	24
Figura 3	<i>Aspergillus niger</i>	25
Figura 4	Instalação experimental	32
Figura 5	Unidade de ultrafiltração tangencial	33
Figura 6	Evolução da biomassa, substrato e produto ao longo da fermentação (T = 35°C e Agitação = 300 rpm)	39
Figura 7	Evolução da sacarose e dos açúcares produzidos durante a fermentação (T = 35°C e Agitação = 300 rpm)	40
Figura 8	Superfície de resposta do modelo determinado para produção de FOS por <i>Aspergillus</i> sp	46
Figura 9	Evolução da concentração do substrato e produtos ao longo da fermentação (T = 35,2 °C e Agitação = 173,6 rpm)	48
Figura 10	Curva de calibração da frutose_1	55
Figura 11	Curva de calibração da frutose_2	56
Figura 12	Curva de calibração da glucose_1	56
Figura 13	Curva de calibração da glucose_2	57
Figura 14	Curva de calibração da sacarose_1	57
Figura 15	Curva de calibração da sacarose_2	58
Figura 16	Curvas de calibração da kestose	58
Figura 17	Curvas de calibração da nistose	59
Figura 18	Curva de calibração da frutafuranosilnistose	59
Figura 19	Exemplo de um cromatograma	60

Lista de Abreviaturas

FOS - Frutooligossacáridos

FOSHU – *Foods for Specified Health Use*

FTase - Fructosiltransferase

Aw – Actvidade da água

DP – Grau de polimerização

GF₂ - Kestose

GF₃ - Nistose

GF₄ – Fructosil-nistose

SmF – *Submerged Fermentation*

SSF – *Solid State Fermentation*

U_t – Actividade de transfrutosilação

U_h – Actividade hidrolítica

AGCC – Ácidos Gordos de Cadeia Curta

FDA – *Food and Drug Administration*

GRAS – *Generally Regarded as Safe*

NCCLS – *National Committee for Clinical Laboratory Standards*

1. Introdução

Neste capítulo é feita uma contextualização do tema do trabalho, assim como a apresentação dos seus objectivos

Nos últimos anos, tem-se verificado uma tendência crescente nos países mais desenvolvidos de substituição de processos de produção de base físico-química por processos biotecnológicos. Esta tendência deu já origem ao desenvolvimento de um novo ramo da Biotecnologia, denominado Biotecnologia Branca ("White Biotech") ou Industrial, que é neste momento apontada como a área da biotecnologia de maior potencial de desenvolvimento.

Este tipo de indústria tem como base a utilização de microrganismos para produção de uma vasta gama de produtos químicos, alimentares, têxteis e energéticos. Em relação ao produto final, este é potencialmente mais barato quando comparado com o obtido por métodos químicos, já que o substrato consumido pelos microrganismos pode ser obtido de fontes renováveis, sendo o impacto ambiental, os desperdícios e os gastos energéticos do processo inferiores.

Prevê-se que futuramente a maior parte dos produtos obtidos por processos químicos sejam substituídos por processos biotecnológicos.

Tendo em consideração a crescente preocupação com a qualidade da alimentação, um novo conceito tem emergido, o conceito de alimentos funcionais, entre os quais podemos destacar os prebióticos, os probióticos e os simbióticos.

Neste trabalho será estudado um tipo de prebióticos em particular, os frutooligosacáridos (FOS). Este trabalho tem como principal objectivo a optimização da produção de FOS por *Aspergillus* sp.

Esta tese encontra-se organizada em cinco partes: no primeiro capítulo é feito um breve enquadramento dos assuntos abordados; no segundo capítulo encontram-se descritos os fundamentos teóricos que suportaram a realização deste trabalho; no terceiro capítulo descreve-se os materiais e os métodos utilizados; no quarto capítulo apresentam-se os resultados, bem como a sua discussão; e no último capítulo apresentam-se as principais conclusões e recomendações para trabalho futuro.

2. Revisão Bibliográfica

2.1. Alimentos Funcionais

Nos dias que correm o conceito da alimentação ganhou uma nova dimensão, pois para além da satisfação das nossas necessidades alimentares básicas, pretende-se prevenir e promover a saúde e o bem-estar. É neste âmbito que surge o conceito dos alimentos funcionais.

O termo alimento funcional nasceu no Japão, sendo este País um dos principais impulsionadores do desenvolvimento de novas técnicas de produção destes alimentos desde 1980.

É de salientar que no Japão, o Ministério da Saúde e do Bem-estar regulamentou a categoria dos alimentos funcionais no ano de 1991, sendo a partir desta data designados de “*Foods for Specified Health Use*” (FOSHU). Para ser considerado FOSHU, um alimento, e não os seus constituintes individuais, tem que promover um efeito fisiológico e a saúde quando consumido (Gibson e Williams 2000).

No decurso do ano de 1996, foi estabelecido de forma consensual o conceito de alimento funcional na Europa, segundo o qual “um alimento pode ser considerado funcional se for satisfatoriamente demonstrado que tem um efeito benéfico numa ou mais funções fisiológicas alvo, para além dos seus efeitos nutricionais intrínsecos, relevante para promover a saúde e bem-estar e/ou reduzir o risco de doença” (Diplock et al 1999).

Tendo em conta a legislação em vigor na maioria dos países, um alimento será considerado como sendo um alimento funcional se cumprir três condições básicas:

1. Ser um alimento derivado de ingredientes naturais;
2. Ser consumido como parte da dieta diária;
3. Apresentar uma função particular após a sua ingestão, servindo para regular um processo metabólico específico, como por exemplo o aumento dos mecanismos de defesa biológica, a prevenção de doenças, o aumento de resistência, ou o controlo das condições físicas de envelhecimento.

Os alimentos funcionais têm sido alvo de muitos estudos por parte da comunidade científica para aferir quais os benefícios que estes podem proporcionar à saúde do consumidor, sempre tendo em conta que estes alimentos não funcionam como medicamentos e nem podem substituí-los. É importante referir que os alimentos funcionais não curam doenças mas possuem componentes activos que podem ajudar a prevenir ou reduzir o risco do consumidor adquirir algumas doenças.

O consumo dos alimentos funcionais tem aumentado nos últimos anos, tendo-se registado um aumento significativo do seu consumo na África do Sul, Brasil, México e Chile, onde o consumidor parece aceitar/confiar mais nos efeitos benéficos proporcionados pelo consumo deste tipo de alimentos.

De entre os alimentos funcionais actualmente disponíveis no mercado destacam-se os probióticos, os prebióticos e os simbióticos.

2.1.1. Probióticos

O termo probiótico foi introduzido na comunidade científica por Lilly e Stillwell em 1965 para descrever “compostos ou extractos de tecidos capazes de estimular o crescimento microbiano”. Posteriormente, o termo probiótico foi redefinido por Fuller em 1989 como sendo um “suplemento alimentar composto de células microbianas vivas, e que apresentam efeitos benéficos para o hospedeiro, por melhorar ou manter o equilíbrio microbiano no intestino” (Suskovic et al 2001).

Os probióticos são microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, produzem um efeito benéfico na saúde do hospedeiro, melhorando as propriedades da microflora indígena (Martinez 2005). Como exemplo de probióticos temos os *Bifidobacterium* e os *Lactobacillus* (tabela 1).

Para ser classificado como probiótico um microrganismo deve apresentar um conjunto de propriedades (Suskovic et al 2001):

- Possuir identificação taxonómica exacta;
- Ser um habitante normal das espécies alvo;
- Não pode ser tóxico ou patogénico;
- Deve ser geneticamente estável;
- Possuir capacidade de sobreviver, proliferar e estimular a actividade metabólica no tracto gastrointestinal;
- Possuir características de aderência e colonização;
- Viabilidade populacional elevada;
- Capacidade de competir com a microflora normal ou espécie específica, ser potencialmente resistente a bacteriocinas, ácidos e outras substâncias antimicrobianas produzidas pela microflora residente;
- Apresentar resistência ao suco gástrico e à bÍlis;
- Ser capaz de exercer efeitos benéficos para a saúde;
- Fornecer qualidades organolépticas desejáveis.

Tabela1- Exemplos de microrganismos descritos como probióticos

<i>Lactobacillus</i>	<i>Bifidobacterium</i>	<i>Streptococcus</i>
<i>L. acidophilus</i>	<i>B. longum</i>	<i>S. thermophilus</i>
<i>L. casei</i>	<i>B. bifidum</i>	
<i>L. johnsonii</i>	<i>B. lactis</i>	
<i>L. fermentum</i>	<i>B. breve</i>	
<i>L. plantarum</i>	<i>B. infantis</i>	
<i>L. lactis</i>		
<i>L. rhamnosus</i>		
<i>L. gasseri</i>		
<i>L. reuteri</i>		
<i>L. salivarius</i>		

2.1.2. Prebióticos

Prebióticos são definidos como hidratos de carbono de origem vegetal ou obtidos por via biotecnológica (fermentação ou síntese enzimática), não digeríveis pelo organismo e que produzem um efeito benéfico na saúde do hospedeiro, estimulando o crescimento dos *Bifidobacterium* e dos *Lactobacillus* no cólon (Huebner et al 2007).

Para ser considerado um prebiótico, um alimento tem que ser selectivamente fermentado por bactérias potencialmente benéficas do cólon, promover efeitos benéficos na saúde, não podendo ser hidrolisado nem absorvido na parte superior da zona gastrointestinal. Os prebióticos têm que ser quimicamente estáveis no processamento de produtos alimentares, ou seja têm que se manter estáveis a valores de pH baixos, altas temperaturas e respeitar as condições da reacção de Maillard (Huebner et al 2007).

Os prebióticos apresentam algumas vantagens em relação aos probióticos. Tecnologicamente são estáveis, pelo que podem ser incorporados num maior número de alimentos, para além de permitirem obter tempos de prateleira superiores. É de salientar que os prebióticos podem suprir a dificuldade que os probióticos enfrentam quando tentam perdurar num ambiente onde já se encontra estabelecida uma determinada flora intestinal (Neesser e German 2004).

Como exemplo de substâncias prebióticas pode-se citar alguns oligossacáridos como a lactulose, o lactitol, a lactosacarose, a rafinose, os frutooligossacáridos (FOS); e polissacarídeos como a inulina e o amido resistente, os xilooligossacáridos e, os galactooligossacáridos entre outros.

2.1.3. Simbióticos

Um alimento simbiótico resulta da combinação de probióticos e prebióticos. Existe uma clara sinergia entre prebióticos e probióticos, dado que a combinação dos dois estimula de uma forma mais eficaz os benefícios para a saúde do hospedeiro.

A tecnologia para produzir alimentos simbióticos é recente e encontra-se ainda em desenvolvimento. Actualmente a selecção do prebiótico a incorporar nos simbióticos é feita com base na tecnologia da indústria alimentar em causa, e em alguns casos pode não considerar a situação óptima de complemento com o probiótico seleccionado. No entanto, a sinergia entre os ingredientes probióticos e prebióticos deve ser aproveitada, nomeadamente o ingrediente probiótico deve ser capaz de utilizar de forma eficiente o ingrediente prebiótico como um substrato no intestino (Neeser e German 2004).

Comparativamente aos prebióticos e probióticos, os simbióticos promovem uma maior estabilidade, viabilidade e funcionalidade do tracto gastrointestinal.

Como exemplo de alimentos simbióticos, pode-se citar as associações das *bifidobacterias* com os galactooligossacarídeos e/ou frutooligossacáridos e dos *lactobacillus* com lactitol.

2.2. Frutooligossacáridos

2.2.1. Ocorrência e Estrutura

Frutooligossacáridos (FOS) são oligossacáridos não digeríveis que ocorrem naturalmente em produtos de origem vegetal, tais como tomate, cevada, cebola, banana, centeio, espargos, alcachofras, entre outros (Hartemink et al 1997). As concentrações de FOS existentes nestes produtos são muito baixas o que torna o processo de extração pouco interessante do ponto de vista económico. Neste sentido, o desenvolvimento de tecnologias de produção de FOS alternativas, nomeadamente por via fermentativa poderá ter um impacto significativo.

Duas classes de enzimas são muito utilizados na produção de FOS por via fermentativa, são eles a fructosiltransferase (Ftase) e a β -fructofuranosidase que também são conhecidos como invertases.

Os FOS podem ser obtidos pela síntese enzimática a partir da sacarose, ou pela hidrólise controlada da inulina. Estes oligossacáridos possuem cerca de 40 a 60% do poder adoçante da sacarose, que como se sabe é um adoçante natural, (Fernández et al 2004). É de referir que os FOS têm um bom poder adoçante mesmo quando são submetidos a pH neutro e a temperaturas superiores a 140°C, e possuem uma baixa actividade da água, $a_w=0,69$.

Os FOS têm uma grande importância como ingredientes para alimentos funcionais devido às suas propriedades prebióticas (Ghazi et al 2006). Como os FOS não são digeridos pelo organismo, após a sua ingestão, passam pelo intestino delgado e alojam-se no intestino grosso onde estimulam o crescimento das Bifidiobacterias regulando a microflora intestinal (Nishizawa et al 2000). É ainda de salientar que os FOS não podem ser utilizados como fonte de energia, o que constitui uma vantagem na medida em que podem ser incorporados em produtos *light* e usados no combate à obesidade.

Tal como referido anteriormente, o consumo regular de FOS pode proporcionar inúmeros efeitos benéficos para a saúde humana, destacando-se a protecção contra cáries, a promoção de uma melhor absorção de minerais (cálcio, magnésio e ferro) no intestino delgado, e também a diminuição do risco de desenvolvimento de cancro do cólon (Passos e Park 2003). Adicionalmente, os FOS permitem diminuir o colesterol, combater a obstipação e reduzir a pressão sanguínea em pessoas hipertensas.

Os FOS são oligossacáridos lineares, constituídos por cadeias com 1 a 4 resíduos de frutose que se encontram ligados à sacarose residual pela ligação β -2 \rightarrow 1 (GF_n, sendo n=1,2,3,4,5 e G e F correspondem a glucose e frutose).

De entre os vários FOS existentes, destacam-se três, a 1-questose (GF₂), a nistose (GF₃) e a fructosil-nistose (GF₄) (Chien et al 2001). Na figura seguinte ilustra-se a estrutura dos principais FOS.

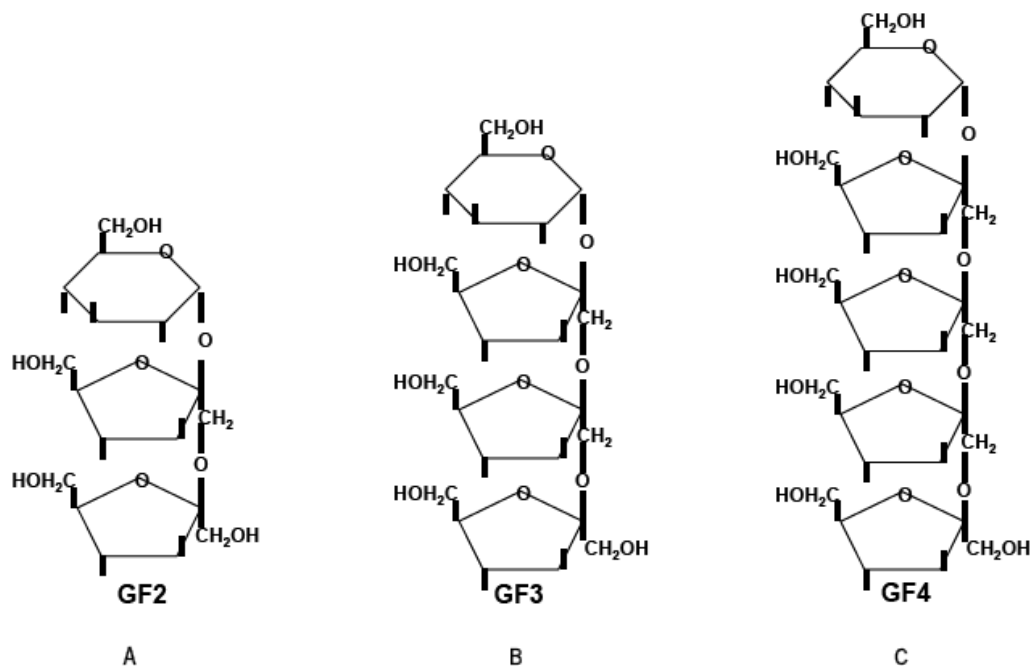


Figura.1- Estrutura da questose (A), nistose (B) e fructosil-nistose (C)

2.3. Métodos de produção dos Frutooligossacáridos

O grande impacto dos alimentos funcionais na sociedade moderna tem sido responsável por um elevado investimento na investigação de novas técnicas para a sua produção. A comunidade científica tem trabalhado no sentido de desenvolver meios de controlar e combater a poluição que, como é conhecido, tem provocado profundas mudanças no planeta. Assim sendo, a produção de alimentos funcionais por processos químicos tem vindo a ser gradualmente substituída por processos de base biotecnológica, que para além de serem menos poluentes permitem aumentar o rendimento de produção e são obtidos a partir de matérias-primas com maior disponibilidade. Neste sentido, tem vindo a ser estudada a produção dos FOS por processos fermentativos que recorrerem a enzimas responsáveis pela degradação da sacarose.

Convencionalmente, a produção biotecnológica de FOS apresenta duas fases, a primeira fase consiste na produção microbiana de enzimas (FTase) por fermentação, e a segunda fase consiste na reacção da FTase com a sacarose (substrato) para produzir FOS sob determinadas condições de operação. Contudo, os parâmetros envolvidos na produção têm que ser optimizados para se obter um máximo rendimento de produção de FOS (Sangeetha et al 2004).

Recentemente tem havido relatos de produção dos FOS num único passo, consistindo na produção de enzimas e na ocorrência das reacções enzimáticas num único processo fermentativo, tornando assim o processo de produção dos FOS mais rentável (Mussatto et al 2009).

A FTase pode ser produzida recorrendo a dois métodos distintos de fermentação, a fermentação submersa (*submerged fermentation* - SmF) e a fermentação em estado sólido (*solid state fermentation* - SSF). A produção de enzimas por SSF tem algumas vantagens relativamente à SmF, nomeadamente o processo é mais simples, a produtividade é superior e há uma menor tendência para ocorrer a contaminação do produto final (Sangeetha et al 2005). Convém referir que a SSF comparativamente com a SmF possui um menor custo de operação, para além de ser um processo que é mais fácil implementar.

A FTase compreende a actividade de transfrutossilação (U_t) e a actividade hidrolítica (U_h). A produtividade da enzima foi estabelecida como sendo o quociente entre a actividade específica e o crescimento celular. Para que haja uma eficiente produção de FOS estes parâmetros devem ser elevados, o que significa que o rácio (U_t/U_h), que indica a força relativa da actividade de transfrutossilação é elevado e, consequentemente a produtividade da enzima é maior, levando assim a um aumento do rendimento da produção dos FOS.

Os parâmetros que mais influenciam a produção da FTase e, consequentemente o rendimento da produção de FOS são a concentração da sacarose e a concentração de fosfato de potássio (KH_2PO_4). Adicionalmente, o pH e o tempo de reacção também influenciam de forma significativa a produção de FOS.

À semelhança da Ftase, a β -frutofuranosidase para além de catalisar a hidrólise da sacarose a glucose e frutose, também tem a capacidade de catalisar a reacção de transfrutossilação para produzir FOS (Sheu et al 2002).

A enzima β -frutofuranosidase pode ser produzida por vários microrganismos, tais como *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus awamori*, *Aspergillus japonicus* e *Aspergillus phoenicis*; *Aureobasidium sp*, *Aureobasidium fusarium* e *Arthrobacter sp* (Cheng et al 1996).

A síntese de FOS a partir da sacarose foi previamente descrita como uma sucessão de reacções (equações 1 a 3), onde a sacarose (GF), a questose (GF_2) e a nistose (GF_3) actuam como dadores de grupos frutossil ou de frutoses, sendo eles próprios também aceitadores (Ouarne e Guibert 1995).



A actividade da β -frutofuranosidase é fortemente inibida pela glucose (Mussatto et al 2009).

O FOS comercial consiste numa mistura de FOS, sacarose e glucose. É de salientar que o maior rendimento de produção conseguido até hoje usando a β -frutofuranosidase encontra-se na gama dos 55-60% de FOS em sacarose. Neste sentido, é necessário desenvolver estratégias com vista a optimizar este rendimento. Para tal, pode-se eliminar a glucose recorrendo ao uso de isomerases. Com a eliminação da glucose, o rendimento de produção de FOS

em sacarose aumentará e poderá chegar a valores iguais ou superiores a 98% (Valdivieso et al 2006).

2.4. Funções e actividade biológica dos Frutooligossacáridos

Nas duas últimas décadas, a comunidade científica tem vindo a focar a investigação no estudo dos aspectos fisiológicos e nutricionais dos FOS. Os FOS apresentam algumas propriedades funcionais que os tornam ingredientes bastante importantes na indústria alimentar.

Como já foi referido, o consumo regular de FOS promove a saúde e o bem-estar, actuando benéficamente em vários locais do nosso organismo, (Tabela 2).

O efeito benéfico resultante da ingestão regular de FOS é mais significativo no cólon, onde estes estimulam o crescimento e a actividade de bactérias benéficas, bem como a diminuição da população de microrganismos patogénicos, como por exemplo *Clostridium*, *Salmonella* e *Listeria*.

A ingestão de FOS provoca um aumento da síntese de ácidos gordos, influenciando o metabolismo dos lípidos e provocando uma diminuição do pH do cólon, o que facilita a absorção de iões minerais, tais como o cálcio, o fósforo e o magnésio.

O equilíbrio produzido na flora gastrointestinal devido ao consumo de FOS é responsável por outros acontecimentos benéficos no metabolismo humano, como a redução da pressão sanguínea em pessoas hipertensas, redução da absorção de hidratos de carbono e melhoria do metabolismo dos diabéticos.

Tabela.2- Principais benefícios da utilização de FOS

Órgão	Vantagens
Boca	Protecção contra cáries;
Intestino delgado	Efeito osmótico de prebióticos de baixo peso molecular;
Microflora	Melhora a absorção dos minerais: cálcio, magnésio e ferro; Aumento selectivo das <i>Bifidobacterium</i> e <i>Lactobacillus</i> no cólon; Redução da contagem de <i>Clostridium</i> ; Prevenção de invasão de patogénicos
Intestino grosso	Produção de AGCC e lactato; Produção de gases, principalmente CO ₂ e H ₂ ; Aumento da biomassa

(Adaptado de Passos e Park 2003)

Os FOS não são hidrolisados na região gastrointestinal superior, pelo que são fermentados no cólon por processos anaeróbios produzindo-se gases e ácidos orgânicos. Destes destacam-se os ácidos gordos de cadeia curta (AGCC) e o ácido láctico. Os AGCC serão posteriormente utilizados como fonte de energia pelas bactérias do cólon, auxiliando assim estas bactérias a proteger a mucosa intestinal (Gibson et al 1995).

O consumo de FOS permite reduzir o risco de contrair algumas patologias humanas, associadas ao número de bactérias intestinais patogénicas, tais como o acne, cirrose hepática, obstipação, intoxicação alimentar e alergias (Yun 1996).

Em suma, os efeitos benéficos proporcionados pelo consumo de FOS encontram-se relacionados com os seguintes mecanismos de acção:

- Produção de AGCC, inibindo o crescimento de células potencialmente cancerígenas, aumentando a diferenciação celular e incrementando a apoptose (processo fisiológico de morte celular) necessária para a manutenção da saúde de todo o organismo.
- Aumento da produção de compostos imunomodulatórios, que possuem actividade anti-cancerígenas.
- Diminuição do crescimento de bactérias prejudiciais e,
- Decréscimo da produção de toxinas bacterianas e substâncias nocivas e potencialmente cancerígenas

2.5. Mercado e produção industrial de FOS

O mercado global dos alimentos funcionais encontra-se avaliado acima dos trinta e três biliões de dólares americanos (Sangetha et al 2005).

O consumo de FOS tem aumentado nos últimos anos, e estudos recentes no mercado europeu mostram que no decorrer do ano de 2000 o mercado de FOS gerou receitas da ordem dos 20,5 milhões de dólares americanos, correspondendo este valor a uma produção de 8500 toneladas de FOS. Estes valores aumentaram em 2003, registando-se uma movimentação de 24,6 milhões de dólares americanos. Para 2010, prevê-se um aumento de produção de FOS na ordem dos 10% ao ano, o que corresponderá a receitas de 47 milhões de dólares americanos, tornando assim o mercado de FOS bastante dinâmico.

Actualmente os FOS comercialmente disponíveis apresentam um alto teor de glucose, frutose e sacarose. Neste sentido, os produtos comercialmente disponíveis contêm apenas 55-60% de FOS.

Tendo em conta as vantagens nutricionais e o baixo valor calórico dos FOS, estes podem ser incorporados em inúmeros produtos alimentares, como por exemplo:

- Produtos *light* – os FOS podem ser utilizados como agentes adoçantes, podendo reduzir em 34% o valor calórico dos alimentos comparativamente com a sacarose, sendo que as características organolépticas da sacarose e dos FOS são bastante similares (Sangetha et al 2005);
- Gelados e sobremesas lácticas;
- Confeitaria (ex. pão, bolos);
- Produtos lácteos (ex. iogurtes);
- Produtos alimentares para animais,
- Produtos para bebés;
- Suplementos alimentares.

É de salientar que as alegações nutricionais e de saúde dos alimentos funcionais, estão contempladas no regulamento europeu (Regulamento (EC) N^o 1924/2006) actualmente em vigor. Este regulamento prevê que as alegações funcionais estejam baseadas em dados científicos credíveis.

É ainda de referir que foi criado na União Europeia o regulamento n^o258/97 (*European Parliament and Council Regulation 258/97*) com o objectivo de analisar novos produtos alimentares e, de acordo com as propriedades apresentadas, aprovar ou não a sua comercialização. Nos Estados Unidos da América esta aprovação é assegurada pela *Food and Drug Administration* - FDA.

2.6. Produção de FOS usando *Aspergillus*

2.6.1. O género *Aspergillus* e as suas vias metabólicas

A primeira menção do género *Aspergillus* data de 1729, altura em que Micheli reportou na *Plantarum* a sua existência. No entanto, a primeira descrição detalhada deste microrganismo foi efectuada no século XIX. Em 1926, foi proposta a primeira classificação do género *Aspergillus*, sendo então classificado em 11 grupos. Posteriormente, Thom e Raper identificaram 14 grupos e, em 1977, Raper e Fennell propuseram 18 (Pitt e Hocking 1997).

Entre os fungos, o género *Aspergillus* é o que mais se encontra na superfície terrestre, sendo também o mais conhecido, pelo que tem despertado o interesse da comunidade científica ao longo do tempo. Actualmente são conhecidas aproximadamente 150 espécies de *Aspergillus*.

Quando observados ao microscópio óptico, os fungos do género *Aspergillus* apresentam um micélio septado hialino (transparente) ou escuro. Parte da massa micelar diferencia-se em conidiósforos com vesículas, que podem ser, esféricas, hemisféricas, elípticas ou clavadas no que diz respeito à sua forma, e podem apresentar uma coloração hialina ou pigmentada.

Os *Aspergillus* podem crescer em ambientes com altas temperaturas, ou que apresentam uma actividade da água muito baixa. Adicionalmente, podem crescer em ambientes em que se verificam ambas as condições acima mencionadas (Pitt e Hocking 1997).

A classificação e identificação de *Aspergillus* sp, baseia-se nas características morfológicas, fisiológicas e reprodutoras, sendo que estas características são comparadas com a chave de identificação recomendada por Pitt (1988).

As espécies de *Aspergillus* são consideradas, do ponto de vista económico, as mais importantes no reino dos fungos, quer pelos benefícios e consequente lucro proporcionado, quer pelo enorme prejuízo que podem causar. Por um lado, são muito utilizados na síntese de químicos, nas transformações biosintéticas e na produção de enzimas. Por outro lado, os *Aspergillus* constituem uma das mais importantes fontes de degradação de alimentos, causando assim enormes prejuízos na indústria alimentar (ex. são produtores de aflotoxina).

A maioria das espécies de *Aspergillus* assume grande importância nas áreas da medicina e da economia (Pitt e Hocking 1997). Por exemplo, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus parasiticus* e *Aspergillus flavus* são patogénicos e reconhecidamente produtores de micotoxinas (metabolito que inviabiliza o uso do microrganismo para aplicação em processos industriais devido às suas actividades carcinogénicas, mutagénicas e teratogénicas). A figura 2 ilustra as espécies *Aspergillus flavus* e *Aspergillus fumigatus*.

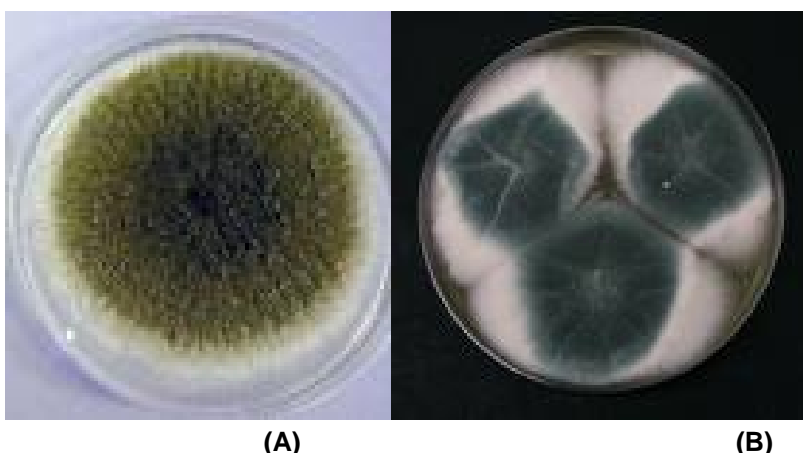


Figura 2. *Aspergillus flavus* (A) e *Aspergillus fumigatus* (B):
<http://www.moldbacteria.com>, acedido a 14-07-09

Independentemente dos problemas que existem relativamente à utilização de alguns destes fungos na indústria alimentar, é indiscutível que outros têm

uma grande relevância numa série de processos industriais, nomeadamente os que pertencem ao grupo que apresenta coloração negra. Estes sendo seguros quanto à toxicidade, são óptimos microrganismos para usar em processos fermentativos, apresentando um elevado nível de secreção de proteínas e podendo produzir diversos enzimas.

É de referir que o *Aspergillus niger*, ilustrado, na figura 3, é uma das poucas espécies de fungos que receberam o estatuto GRAS (*Generally Regarded as Safe*) atribuído pela FDA.

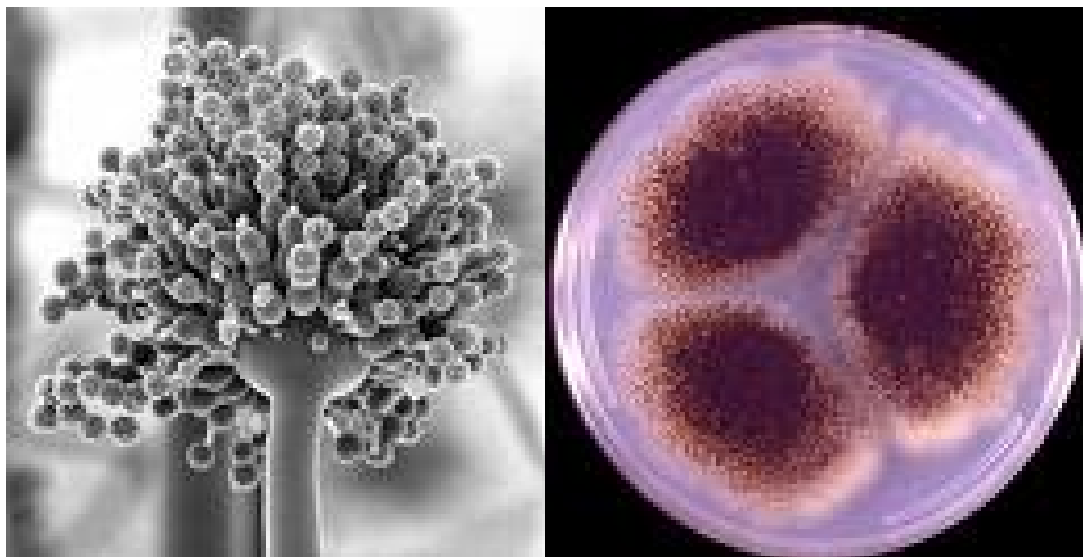


Figura.3. *Aspergillus niger*: <http://www.moldbacteria.com> acedido a 14-07-09

2.7. *Aspergillus*: preparação de inóculos e crescimento

É aconselhável efectuar a preparação de inóculos de *Aspergillus* em câmaras de segurança biológica de classe IIA ou IIB. A norma M29 – *Protection of laboratory workers from occupationally acquired infections* do, NCCLS (*National Commitee for Clinical Laboratory Standards*) fornece uma descrição detalhada dos procedimentos a adoptar.

O crescimento dos *Aspergillus* depende de alguns factores, entre os quais se destacam a actividade da água, temperatura, pH, concentração e tipo de nutrientes, concentração de substrato e conservantes. Adicionalmente, é de referir que o crescimento da *Aspergillus* é um processo aeróbio, o que acontece em geral para todos os fungos.

Os *Aspergillus* podem crescer em ambientes com uma actividade da água compreendida entre 0.75 e 0.996 (Pitt e Hocking 1997).

No que diz respeito à temperatura, o *Aspergillus* pode crescer em ambientes com temperaturas entre 10 e 43°C. No entanto, o crescimento óptimo é observado a 33°C.

O efeito do pH no crescimento do *Aspergillus* depende da composição do meio. O *Aspergillus* pode crescer em meios com valores de pH entre 2 e 11, sendo que o crescimento óptimo é observado para valores de pH compreendidos entre 5 e 8.

2.8. *Aspergillus* como produtores de FOS

Os FOS podem ser produzidos comercialmente a partir da sacarose, recorrendo para tal a enzimas que apresentam actividade de transfructosilação. Estes enzimas podem ser encontrados em fungos como *Fusarium* sp, *Aspergillus* sp e *Aureobasidium* sp. No entanto, só alguns destes fungos apresentam potencial para ser aplicados na produção de FOS à escala industrial devido à baixa actividade de transfructosilação que evidenciam, sendo as variantes de *Aspergillus* as mais usadas (Fernández et al 2004).

A produção em contínuo de FOS a partir de *Aspergillus* pode ser efectuada através da acção de enzimas imobilizados com actividade de transfructosilação, ou usando células onde se encontram estes enzimas produtores de FOS (Chien et al 2001).

O *Aspergillus japonicus* tem sido considerado por vários grupos de investigadores como uma das variantes de *Aspergillus* que melhor se adapta à produção industrial de FOS. Estudos revelam que o *A. japonicus* pode produzir a β -fructofuranosidase com elevada actividade de transfructosilação, pelo que é considerado um bom produtor de FOS (Mussatto et al 2009).

O *A. niger*, um fungo filamentoso não patogénico e que tem o estatuto GRAS, tem sido muito utilizado na produção de enzimas. Este microrganismo pode vir a tornar-se no microrganismo ideal para a produção de FOS (Nguyen et al 2004).

Park e Almeida (1991), e Wallis e colaboradores (1997), revelaram que o uso de sacarose, como substrato para a produção de FOS, induz algumas modificações no que respeita à secreção de enzimas β -fructofuranosidase extracelulares em *A. niger* (Nguyen et al 2004).

Estudos realizados com o *A. niger*, revelaram que esta espécie pode produzir FTase intracelular com rendimentos de produção de FOS na ordem dos 54%, usando para tal 50% de sacarose como substrato (Sangetha et al 2005).

2.9. Produção de FOS por via fermentativa usando *Aspergillus*

A produção em grande escala de FOS pode ser realizada através da imobilização da β -fructofuranosidase em bio-reactores convencionais (Cheng et al 1995).

Pode-se proceder a imobilização de β -frutofuranosidase em suportes inorgânicos tais como o vidro poroso ou sílica porosa (Cheng et al 1995).

Com o intuito de produzir FOS em larga escala e com melhores rendimentos, utilizaram-se células de *Aspergillus* imobilizadas em alginato de cálcio. No Japão, há duas grandes empresas do ramo alimentar que recorrem a este método para a produção de FOS (Chiang e Lee 1997).

Chien e Lin (2001), propuseram o uso do glúten como suporte para a imobilização de células inteiras ou de enzimas com actividade de fructosiltransferase, para uso na produção de FOS a nível industrial. O glúten é um polímero natural e apresenta algumas vantagens para ser utilizado como matriz de imobilização de células, nomeadamente o facto de ser biodegradável, economicamente viável e não tóxico.

Foram utilizados na produção de FOS sistemas de reactores de fluxo membranar e sistemas de biocatálise incorporados em bio-reactores equipados com sistemas de microfiltração, tendo-se alcançado um rendimento na ordem dos 98% de FOS em sacarose, pois durante o processo procedeu-se à remoção da glucose que, como se sabe, inibe a produção de FOS (Sangeetha et al 2005).

Um sistema de reciclagem de células foi desenvolvido com o objectivo de reutilizar a produção da FTase e, consequentemente aumentar o rendimento da produção de FOS. Este método é economicamente viável e possibilita a produção de FOS em maiores quantidades comparativamente com os métodos de fermentação tradicionais (Sangeetha et al 2005).

No entanto, a imobilização de enzimas torna o processo de produção de FOS à escala industrial dispendioso, dado que durante o processo de imobilização os enzimas perdem 60 – 90% da sua actividade. É ainda de referir que a fase de produção e imobilização de enzimas é bastante moroso e trabalhoso (Cheng et al 1995).

No sentido de rentabilizar a produção de FOS a nível industrial têm-se efectuado estudos para a produção de FOS num só passo, no chamado método integrado de produção de FOS.

O método integrado evita o passo de produção, separação e imobilização dos enzimas, simplificando assim o processo de produção e reduzindo naturalmente os custos de operação.

Durante o processo de fermentação, é necessário ter em conta o pH do meio, bem como a temperatura que terá que se manter constante de modo a evitar choques térmicos indesejáveis.

Se a fermentação for efectuada com arejamento, convém controlar o fluxo de oxigénio a ser utilizado durante o processo de fermentação.

Este trabalho tem como principal objectivo maximizar a produção de FOS a partir de *Aspergillus* sp, recorrendo ao desenho experimental para definir o conjunto condições de fermentação que permite otimizar o processo.

2.10. Desenho factorial de experiências

O planeamento experimental, o desenho factorial e o desenho experimental são conceitos mais ou menos similares, que são utilizados na

investigação da relação matemática existente entre as variáveis de entrada e de saída de um sistema.

Os fundamentos e a metodologia do desenho factorial de experiências são conhecidos desde os anos 1900. No entanto a sua aplicação à biotecnologia é bastante recente.

A utilização do desenho factorial de experiências para avaliar importantes variáveis experimentais num bioprocessamento ou para a optimização destas variáveis, revela que esta metodologia é uma ferramenta poderosa que possibilita a redução do número de experiências necessárias para implementar um sistema e permite reduzir a polarização experimental deste sistema (Mandenius et al 2008).

Num processo de optimização, a utilização do desenho experimental é claramente vantajosa em relação aos modelos que variam uma variável de cada vez, pois com a variação de uma única variável é provável que se termine a optimização sem encontrar o ponto óptimo pretendido.

Ao recorrer ao desenho experimental para otimizar um processo, a aproximação a um resultado que inspire confiança pode ser alcançado com a realização de algumas experiências, após encontrar este resultado pode-se avançar numa direcção mais favorável para encontrar o ponto óptimo pretendido e sujeitar este ponto a validação (Mandenius et al 2008).

Quando as experiências chegam ao fim, os resultados obtidos podem ser analisados estatisticamente usando uma regressão linear múltipla para obter um modelo. Este modelo descreve a relação matemática entre uma ou mais variáveis independentes com variável de resposta de acordo com a seguinte equação (Mandenius et al 2008):

$$Y_i = \beta_0 + \beta_1 x_{i1} + \dots + \beta_p x_{ip} + \varepsilon_i$$

Com $i=1,2,\dots,n$

3. Materiais e Métodos

Neste capítulo proceder-se-á a apresentação dos materiais e métodos utilizados neste trabalho.

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Fermentações do Departamento de Engenharia Biológica da Universidade do Minho.

Tendo como objectivo principal a optimização da produção dos FOS, por via fermentativa, usou-se o fungo *Aspergillus* sp. A preparação dos inóculos deste fungo seguiu o protocolo descrito na secção 3.2.

O planeamento das fermentações a conduzir foi feito recorrendo ao desenho experimental, descrito neste capítulo.

3.1 Propagação do inóculo de *Aspergillus* sp

O microrganismo utilizado neste trabalho foi o fungo *Aspergillus* sp, que foi cultivado em placas com o meio Czapek Dox Agar.

Para o efeito, preparou-se uma solução do meio Czapek Dox Agar, transferiu-se 30 mL desta solução para um matraz que de seguida foi esterilizado.

De seguida, procedeu-se a uma transferência de esporos de *Aspergillus* sp de uma placa para um meio de agar semi-sólido com 0,2% de Tween80 previamente preparado. De seguida é transferida uma pequena porção desta suspensão para o matraz com o meio Czapek Dox Agar. Este processo é efectuado em condições de assepsia e os materiais utilizados são estéreis de modo a diminuir o risco de contaminação. Como os fungos do género *Aspergillus* produzem um grande número de esporos, a etapa de transferência dos esporos foi realizada numa câmara de fluxo laminar.

O crescimento do fungo foi efectuado numa estufa a 25°C, durante 5 dias. Após o crescimento, procedeu-se à lavagem e remoção dos esporos do fungo, tendo-se recorrido a uma solução de Tween80 a 0.1% previamente preparada e esterilizada com um magneto. Esta suspensão foi agitada numa placa de agitação, sendo o magneto utilizado para remover todos os esporos da superfície do agar.

A contagem dos esporos necessários para arrancar a fermentação foi efectuada numa câmara de Neubauer.

É de salientar-se que durante o período de optimização, as placas com o fungo *Aspergillus* sp, foram replicadas periodicamente de modo a garantir que o fungo não perdia viabilidade.

As fermentações efectuadas durante o processo de optimização da produção dos FOS, seguiram o procedimento abaixo descrito.

3.2 Método de produção de FOS por fermentação descontínua de sacarose por *Aspergillus* sp.

3.3.1. Reagentes

Durante o processo de optimização da produção de FOS por *Aspergillus* sp, o meio de fermentação utilizado foi sempre o mesmo. Na tabela seguinte encontra-se a descrição dos reagentes utilizados bem como a sua concentração.

Tabela 3 Composição do meio de fermentação

Composto	Concentração / g.L ⁻¹
Sacarose	200
NaNO ₃	20
KCl	0,5
KH ₂ PO ₄	5
FeSO ₄ .H ₂ O	0,01
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,1
K ₂ SO ₄	0,35

O pH de todas as fermentações deste desenho experimental foi mantido sempre constante, pH = 6. Para controlar este valor recorreu-se a duas soluções, ácido e base, nas seguintes concentrações:

Controlo de pH

- Base: Solução de amónia 6 %
- Ácido: Solução de ácido orto-fosfórico 21 %

3.3.2. Equipamento

A instalação experimental utilizada durante o processo de optimização da produção de FOS, é constituída por um fermentador de 5 L da Braun com controlo de pH e sondas de temperatura e oxigénio (Figura 4). De modo a assegurar que a temperatura de fermentação se mantinha no valor pretendido, recorreu-se a um banho termostaticado.

A esterilização da sacarose utilizada em todas as fermentações foi efectuada usando uma unidade de ultra-filtração tangencial da Millipore (Figura 5).

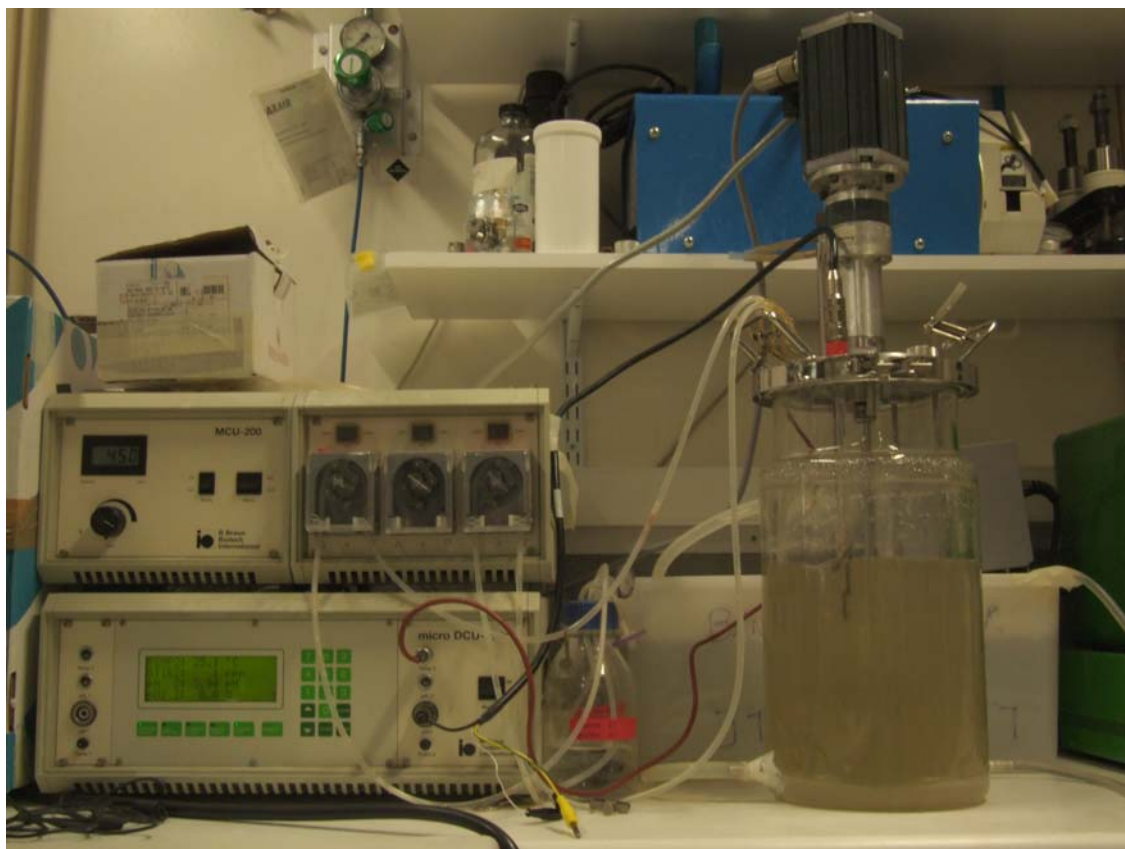


Figura 4. - Instalação experimental

3.3.3. Preparação dos meios de fermentação

Inicialmente foi preparado uma solução de sais (nitrato de sódio, cloreto de potássio, sulfato de potássio e sulfato de magnésio) em 1680 mL de água

destilada. A solução de sais foi colocada no fermentador e esterilizada a 121 °C durante 30 min.

O di-hidrogenofosfato de potássio foi preparado à parte dos restantes sais, pois este sal precipita caso seja esterilizado junto com os outros sais. Assim sendo, preparou-se uma solução de 100 mL deste sal que foi esterilizado 121 °C durante 15 min.

Como já foi referido, a sacarose utilizada durante este processo de optimização foi esterilizada por filtração numa unidade de ultrafiltração tangencial da Millipore.

Para o efeito foram preparados 3 L de uma solução de sacarose a 400 g.L⁻¹, sendo de seguida efectuado o processo de ultrafiltração recorrendo-se a uma cassette de 30 kDa.

O processo de ultrafiltração foi efectuado numa câmara de fluxo laminar, de modo a diminuir o risco de contaminação. Antes de filtrar a sacarose, é necessário proceder à lavagem do sistema fazendo passar por este água destilada, uma solução de NaOH a 0,1 M e água ultra pura. Após a lavagem do sistema filtrou-se 2 L de sacarose para um frasco Schott de 2 L previamente esterilizado. No final é necessário repetir o procedimento de lavagem do sistema.



Figura 5. Unidade de ultrafiltração tangencial

3.3.4. Fermentação

Antes de arrancar a fermentação é necessário preparar uma solução de 20 mL de sulfato de ferro e fazer passar esta solução por um acrodisco estéril de 0.2 μm , filtrando esta solução directamente para o frasco schott onde se encontra a solução de sacarose. Também foi transferida para este frasco a solução di-hidrogenofosfato de potássio, sendo este processo sempre efectuado na câmara de fluxo laminar.

Após esterilização e arrefecimento do fermentador, onde já se encontra a solução de sais, procedeu-se à transferência da solução de sacarose, sulfato de ferro e di-hidrogenofosfato de potássio do frasco schott para o fermentador, sendo este processo assegurado por intermédio de uma bomba peristáltica.

De seguida, encaixou-se o motor de agitação no veio do agitador do fermentador e ligou-se a agitação nas rotações pretendidas.

Após a ligação da agitação do fermentador, encheu-se a camisa do fermentador com água e a temperatura do fermentador foi estabilizada e mantida constante durante todo o tempo de fermentação por intermédio de um banho termostatzado.

Tendo estabilizado a temperatura e a agitação do fermentador, procedeu-se à calibração da sonda de pH, após o que se iniciou o controlo de pH para o valor de referência pH = 6.

De seguida, tirou-se uma amostra do meio de fermentação, denominada de amostra no tempo zero.

Depois de retirar a amostra inicial, procedeu-se à inoculação do meio fermentativo com 200 mL de meio com o número de esporos necessários para arrancar a fermentação.

Após a inoculação retirou-se outra amostra do meio fermentativo, tendo a recolha de amostras continuado durante todo o tempo de fermentação (96 h) em intervalos de tempo definidos. As amostras recolhidas foram utilizadas para o doseamento dos açúcares e da biomassa.

3.4. Desenho experimental

O desenho experimental é uma ferramenta que é sistematicamente utilizada para examinar diferentes tipos de problemas que acontecem durante a investigação e desenvolvimento de produtos.

De forma a reduzir o risco de ocorrência de erros experimentais e ter uma aproximação mais eficaz do que se pretende encontrar convém planear as experiências de acordo com um desenho experimental (Lundstedt et al 1998).

O número de fermentações a efectuar durante o processo de optimização da produção de FOS por *Aspergillus* sp é obtido através da expressão $2^n + 3$, em que n representa o número de parâmetros que se pretende variar durante este processo e 3 representa o número de fermentações que será efectuado no ponto central do desenho experimental, espera-se que é no ponto central que o

rendimento de produção de FOS seja máximo, ou seja prevê-se que o ponto óptimo de produção esteja perto do ponto central.

Neste caso, os parâmetros do desenho experimental são a temperatura que varia entre os 25 e os 45 °C, e a agitação que varia entre os 150 e os 450 rpm: Estes valores foram estipulados com base na literatura e resultados preliminares (não publicados).

Na tabela 4 encontram-se reunidas as condições experimentais estudadas em cada uma das fermentações realizadas neste trabalho:

Tabela 4 Desenho experimental

Fermentação	Condições	
	Temperatura / °C	Agitação / rpm
1	25	150
2	35	300
3	35	300
4	25	450
5	35	300
6	45	150
7	45	450

É de salientar que, uma vez que o ponto óptimo de produção não foi encontrado com a realização destas fermentações, o desenho experimental teve que ser alargado de modo a encontrar este ponto. Assim, foram efectuadas mais quatro fermentações nas condições descritas na Tabela 5.

Tabela 5 Desenho experimental alargado

Fermentação	Condições	
	Temperatura / °C	Agitação / rpm
1	20,86	300
2	49,14	300
3	35	87,9
4	35	512,1

Com o objectivo de estudar a evolução das fermentações conduzidas, determinou-se a concentração de biomassa (método de determinação de biomassa por peso seco no micro-ondas) e dos diferentes sacarídeos (HPLC) ao longo do tempo.

3.5. Método de determinação de biomassa em peso seco no micro-ondas

Inicialmente seca-se um filtro de porosidade 0,45 μm no micro-ondas durante 10 minutos a 150 W. Seguidamente, o filtro é colocado durante 10 a 15 minutos no excicador para poder arrefecer.

Após o arrefecimento, o filtro é pesado, e em seguida filtra-se uma suspensão celular de 10 mL e lava-se as células com água destilada.

Depois da filtração, o filtro é novamente colocado no micro-ondas para secar, durante 15 minutos a 150 W. Seguidamente, o filtro é colocado durante 10 a 15 minutos no excicador para poder arrefecer.

Finalmente, o filtro é pesado, e a concentração da biomassa pode ser determinada pela razão entre esse peso e o volume filtrado. É de referir que este procedimento é efectuado em triplicado para cada amostra.

3.6. Método para quantificação de sacarídeos por HPLC

A metodologia adoptada pelo consórcio BIOLIFE utiliza uma coluna com uma fase estacionária constituída por um gel polimérico hidrofílico com grupos funcionais amina.

Esta coluna tem como principais características, a alta eficiência, boa estabilidade, boa reprodutibilidade e maior duração do que as colunas de sílica sendo que a resolução é semelhante para estas colunas

A estabilidade do gel polimérico permite a utilização de eluentes orgânicos ou aquosos. O pH pode variar entre 2 e 13, permitindo uma variedade de tampões e maior possibilidade de optimização da fase móvel e portanto da eficiência cromatográfica.

O eluente utilizado consiste numa mistura de acetonitrilo e água (70:30 v/v) com 0,04% de hidróxido de amónia. O caudal utilizado foi de 1,0 mL.min⁻¹ (Dias et al 2009).

A resposta do detector de índice de refração foi gravada e integrada usando o *Star Chromatography Workstation Software*.

Tabela 6. Tempos de retenção aproximados (min) dos açúcares separados na coluna amina, nas condições descritas.

Sacarídeo	Tempo de retenção / min
Frutose	5,7
Glucose	6,7
Sacarose	8,0
Questose	11,2
Nistose	15,0
Frutafuranosilnistose	21,0

4. Resultados e Discussão

Neste capítulo proceder-se-á à apresentação e análise dos resultados obtidos durante a optimização da produção FOS por *Aspergillus* sp.

4.1. Optimização da produção de FOS por *Aspergillus* sp

A optimização da produção de FOS foi efectuada estudando 2 variáveis operacionais em diferentes condições, nomeadamente a temperatura e a agitação. Recorrendo à metodologia de desenho factorial de experiências foram efectuadas 7 fermentações nas condições descritas na tabela 4.

Na figura seguinte, pode-se observar-se a evolução das concentrações de substrato (sacarose), biomassa e FOS total produzido ao longo do tempo para uma temperatura de 35 C e uma agitação de 300 rpm.

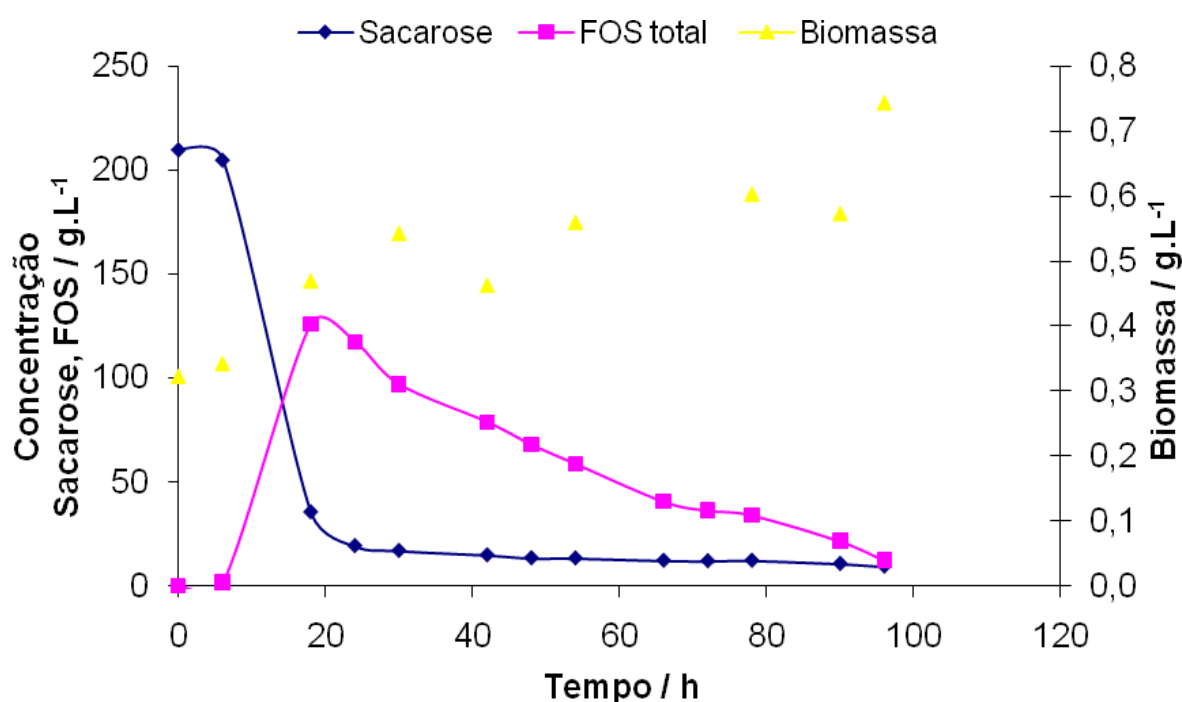


Figura 6. Evolução da concentração de biomassa, substrato e FOS total ao longo da fermentação (T = 35 C e Agitação = 300 rpm)

Ao analisar a Figura 6 constata-se que a concentração da biomassa aumenta ao longo do tempo de fermentação. Adicionalmente,   medida que a sacarose é consumida d -se a formação de FOS.

O ponto onde a concentração de FOS total   máxima ($C_{FOS} = 126,03 \text{ g.L}^{-1}$) coincide com o ponto para o qual a sacarose já foi praticamente consumida ($C_{sacarose} = 35,54 \text{ g.L}^{-1}$), o que significa que neste ponto já foi consumida cerca de 80% da sacarose. A partir deste ponto a produção de FOS diminui gradualmente até ao final da fermentação, porque a concentração de sacarose   baixa e a sua degradação para formar FOS é menos eficaz, para  l m de se atingirem concentrações de glucose e frutose que são inibitórias.

Para  l m de FOS, durante este processo são produzidos outros subprodutos, nomeadamente glucose e frutose. A produção destes açúcares

constitui um dos maiores problemas no processo de produção de FOS devido às concentrações inibitórias que se obtêm. Neste sentido, um dos desafios futuros será encontrar uma forma de contornar este problema maximizando assim o rendimento de produção dos FOS.

Na figura seguinte pode-se observar a evolução da concentração de frutose e glucose ao longo do tempo, bem como dos diferentes tipos de FOS produzidos, nomeadamente questose, nistose e frutafuranosilnistose.

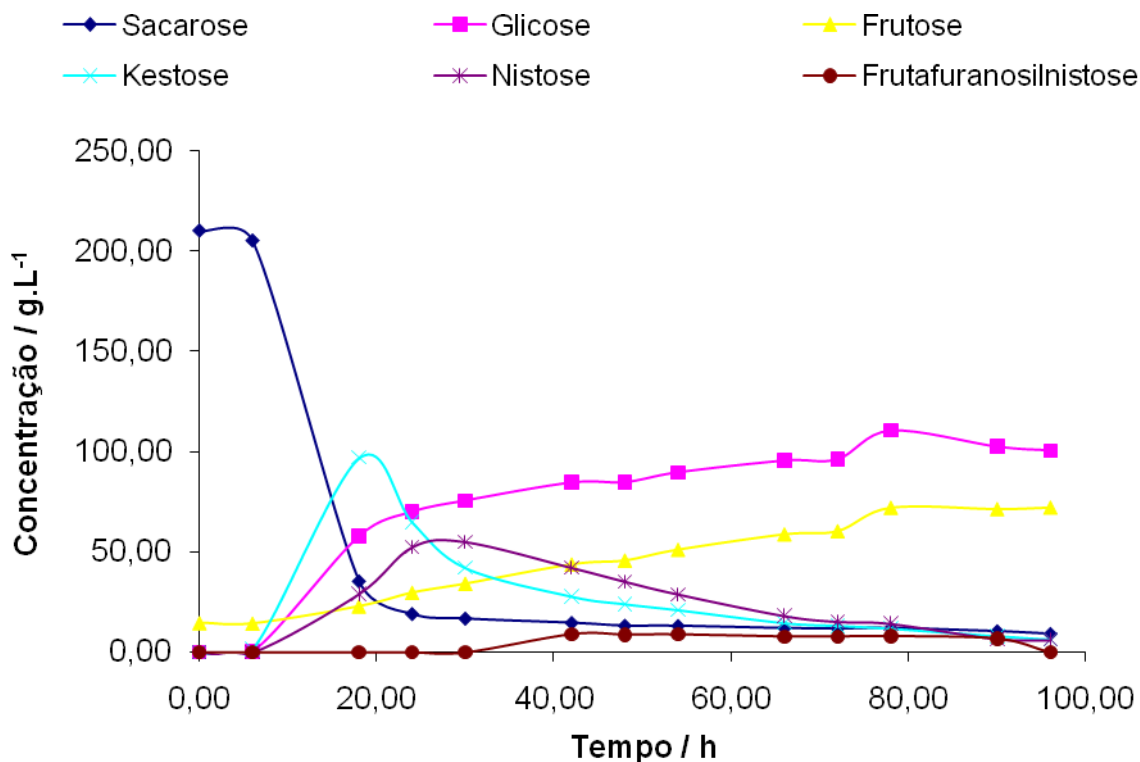


Figura 7. Evolução da sacarose e dos açúcares produzidos durante a fermentação (T = 35°C e Agitação = 300 rpm)

Note-se que a concentração de glucose e frutose aumentam ao longo do tempo, e à medida que a sacarose vai sendo consumida. Mesmo quando a concentração de sacarose no meio é residual, a concentração de glucose e frutose continuam a aumentar ao mesmo tempo que a produção dos FOS diminui, confirmando-se assim que limitam a produção de FOS. Esta observação está de acordo com os resultados previamente reportados por (Yoshikawa et al 2008) e (Mussatto et al 2009).

Os resultados obtidos nas 7 fermentações efectuadas podem ser consultados na Tabela 7.

Da análise da Tabela 7 constata-se que para valores elevados de temperatura e de agitação o rendimento de produção dos FOS é menor, o que é explicado pelo facto de nestes pontos extremos o crescimento da biomassa ser mínimo e as tensões de corte provocadas pelo aumento da agitação serem maiores, o que se traduz numa menor conversão da sacarose em FOS. Esta situação é mais evidente na fermentação 7, onde são conjugadas estas

condições e, como resultado a sacarose no meio praticamente não é consumida sendo a formação de produto residual.

Na situação em que a temperatura e a agitação são mais baixas (fermentação 1), o rendimento da produção dos FOS é semelhante ao obtido para os pontos centrais, (agitação = 300 rpm e temperatura = 35 °C). No entanto, a fase de latência é bastante maior, ou seja o inóculo demora mais tempo a adaptar-se levando a um atraso no início da conversão da sacarose. Nos pontos centrais, a adaptação do inóculo ao meio é mais rápida reflectindo-se numa rápida conversão da sacarose, factor que a nível industrial traz inúmeras vantagens, nomeadamente a diminuição do tempo de fermentação reduzindo assim os custos operacionais. Os resultados indicam que o ponto óptimo de produção de FOS por *Aspergillus* sp estará perto do ponto central, o que está de acordo com o que era teoricamente esperado (Mandenius et al 2008).

Tabela 7 Resultados das fermentações realizadas nas condições do desenho experimental (tempo total de fermentação 96h)

Fermentação	Condições		Produção máxima FOS	Rendimento
	Temperatura / °C	Agitação / rpm	(g.L ⁻¹)	(g _{FOS} /g _{sacarose})
1	25	150	120,50	0,62
2	35	300	127,32	0,61
3	35	300	126,03	0,60
4	25	450	112,18	0,56
5	35	300	132,32	0,62
6	45	150	115,76	0,53
7	45	450	35,28	0,17

Na tentativa de encontrar o ponto óptimo de produção e desenvolver um modelo que represente este processo, procedeu-se à análise estatística dos resultados. Desta análise não foi possível encontrar um ponto óptimo de produção, dado que o modelo obtido converge para um ajuste quadrático. Neste sentido, foi necessário expandir o desenho experimental.

4.2. Expansão do desenho experimental

O modelo inicial (obtido com base nos resultados da Tabela 6) revelou ter uma curvatura significativa pelo que o desenho experimental teve que ser expandido, no intuito de encontrar o ponto óptimo de produção de FOS.

A expansão do desenho experimental foi feita partindo dos pontos centrais do modelo inicial, ou seja a T = 35 °C e Agitação = 300 rpm.

Nesta fase do trabalho foram efectuadas mais quatro fermentações, nas condições descritas na Tabela 5.

Os resultados obtidos nestas fermentações encontram-se representados na seguinte tabela.

Tabela 8 Resultados das fermentações realizadas nas condições do desenho experimental alargado (tempo total de fermentação 96h)

Fermentação	Condições		Produção máxima FOS	Rendimento
	Temperatura / °C	Agitação / rpm	(g.L ⁻¹)	(g _{FOS} /g _{sacarose})
1	20,86	300	125,34	0,65
2	49,14	300	0,00	0,00
3	35	87,9	160,18	0,81
4	35	512,1	116,77	0,62

Ao analisar estes resultados confirma-se que para valores elevados de temperatura o inóculo de *Aspergillus* sp não se adapta ao meio, perdendo assim a viabilidade. Consequentemente, a biomassa não cresce, pelo que a sacarose do meio não se converte o que resulta na baixa produção de FOS.

Verifica-se que a variação da temperatura tem um maior impacto na produção dos FOS do que a variação da agitação, o que é explicado pelo facto da biomassa não crescer a temperaturas elevadas, e este factor ser mais decisivo do que as tensões de corte provocadas pelo aumento da agitação. No entanto, é de salientar que para baixos valores de agitação o crescimento da biomassa tende a aumentar o que leva a uma maior conversão da sacarose em FOS.

Convém referir que nesta fase do trabalho também se verificaram os mesmos problemas no que se refere à inibição da produção dos FOS pela crescente produção de glucose e frutose ao longo do tempo de fermentação.

Do tratamento dos resultados obtidos nestas fermentações usando o *software Design Expert* (versão, 7.1.6 trial), obtiveram-se três modelos cúbicos.

Estes modelos são traduzidos matematicamente segundo as seguintes equações, onde Y representa a produção de FOS total (g_{FOS} / g_{sacarose}), T representa a temperatura (°C) e Ag representa a agitação (rpm).

Equação do modelo 1:

$$Y = 1,24 - 0,15T + 7,558 \times 10^{-3} Ag + 6,082 \times 10^{-3} T^2 - 2,438 \times 10^{-5} Ag^2 - 4,500 \times 10^{-5} T \times Ag - 7,195 \times 10^{-5} T^3 + 2,723 \times 10^{-8} Ag^3$$

Equação do modelo 2:

$$Y = 3,84 - 0,28T - 6,000 \times 10^{-3} Ag + 7,912 \times 10^{-3} T^2 + 3,838 \times 10^{-4} T \times Ag - 7,195 \times 10^{-5} T^3 - 6,126 \times 10^{-6} T^2 \times Ag$$

Equação do modelo 3:

$$Y = 3,86 - 0,28T - 6,073 \times 10^{-3} Ag + 7,920 \times 10^{-3} T^2 + 1,204 \times 10^{-7} Ag^2 \\ + 3,838 \times 10^{-4} T \times Ag - 7,195 \times 10^{-5} T^3 - 6,126 \times 10^{-6} T^2 \times Ag$$

Minimizando as equações destes modelos determinam-se as condições experimentais que maximizam a produção de FOS. Estes pontos encontram-se descritos na Tabela 9.

Tabela 9. Pontos optimos dos modelos

	Modelo 1	Modelo 2	Modelo 3
Temperatura (°C)	32.5	*	32,1
Agitação (rpm)	173.6	*	478,86
Rendimento previsto (g _{FOS} /g _{sacarose})	0.703	*	0.6053

* a resolução dá impossível

É possível estabelecer dois modelos cúbicos significativos, o modelo 1 e o modelo 3, pois o modelo 2 não tem resolução possível. No entanto, convém referir a existência de pontos de sela significativos nos modelos, o que dificulta a selecção das condições que maximizam a produção dos FOS.

Tendo em conta os resultados obtidos nas fermentações anteriores, é aconselhável escolher o modelo 1 para posterior validação experimental, visto que os valores da temperatura e da agitação do modelo 3 se aproximam dos extremos do desenho. Recordar-se que para valores elevados de agitação a produção dos FOS é menor, e neste caso a Agitação é de 478,86 rpm.

Adicionalmente, o valor do rendimento previsto pelo modelo 3 é inferior a muitos obtidos nas fermentações já efectuadas (ver Tabelas 6 e 8). O rendimento previsto pelo modelo 1 é de 70,3 %, o que é superior ao que se obtém actualmente na produção de FOS. No entanto, já há relatos na literatura de que será possível obter rendimentos de produção de FOS na ordem dos 75%, caso a questose seja o único FOS produzido (Yoshikawa et al 2008) e de 98% caso se resolva o problema das concentrações inibitórias de glucose e frutose.

Tendo em conta estes factores, o modelo escolhido para validação experimental será o modelo 1.

4.3. Validação do modelo experimental

Como já foi referido o modelo escolhido para validar o desenho experimental e terminar este processo de optimização da produção dos FOS por *Aspergillus* sp foi o modelo 1.

Recorrendo a este modelo foram efectuadas três fermentações no ponto óptimo do modelo, ou seja $T = 35,2^{\circ}\text{C}$ e Agitação = 173,6 rpm. Espera-se que o rendimento de produção de FOS nestas fermentações se aproxime do rendimento previsto pelo modelo, ou seja $0,703 \text{ g}_{\text{FOS}}/\text{g}_{\text{sacarose}}$.

As condições do modelo 1 encontram-se especificadas a seguir, assim como o teste ANOVA a que este modelo foi sujeito.

MODELO 1

Resposta:		Produção FOS (Y)		
Factor	Nome	Unidades	nível -1	nível +1
A	Temperatura	$^{\circ}\text{C}$	25	45
B	Agitação	rpm	150	450

Tabela 10. Teste ANOVA do modelo 1

Fonte	Soma dos Quadrados	Média dos quadrados	Valor de F	Prob > F
Modelo	0,41	0,058	88,26	0,0018
Falta de ajuste	$1,979 \text{ E}^{-3}$	$6,597 \text{ E}^{-4}$	6,48	0,1258
Erro	$4,667 \text{ E}^{-4}$	$1,512 \text{ E}^{-3}$		

Tabela 11. Valores dos parâmetros do teste ANOVA do modelo

R^2	0,9952
R^2 ajustado	0,9839
R^2 de previsão	0,7611
Precisão	26,935

Analisando os parâmetros fornecidos pelo teste ANOVA, conclui-se que este modelo é viável pois os parâmetros R^2 , R^2 de previsão, R^2 ajustado e precisão apresentam valores muito satisfatórios.

Normalmente um modelo experimental é validado tendo em conta dois parâmetros, R^2 e o R^2 de previsão.

O R^2 é a fracção da variação da resposta que pode ser explicada pelo modelo, ou seja descreve se o modelo é bom ou não, e se os resultados obtidos podem ser reproduzidos num modelo matemático.

O R^2 de previsão é uma fracção da resposta prevista pelo modelo sujeita a validação, este parâmetro descreve se a previsão do modelo é boa ou não.

Este modelo apresenta um valor muito bom de R^2 ($R^2 = 0,9839$) pois é superior ao valor que é necessário para garantir a viabilidade do modelo ($R^2 = 0,75$) (Mandenius et al 2008).

Do mesmo modo este modelo apresenta um valor bastante bom do R^2 de previsão (R^2 de previsão = 0,7611) que é muito superior ao valor reportado na literatura como sendo necessário para garantir a viabilidade do modelo (R^2 de previsão = 0,60) (Mandenius et al 2008).

Ao analisar o valor de F, parâmetro que permite aferir se o modelo tem significado ou não, constata-se que o modelo é significativo já que $F = 0,0018$ o que é bastante inferior a 0,05, ou seja a probabilidade deste modelo descrever o processo de produção de FOS é superior a 95 %.

Nota-se que a falta de ajuste do modelo não é significava, apresentando um valor de 0,1258, superior a 0,05 que é o valor teórico a partir do qual se considera que a falta de ajuste do sistema não significava.

No que diz respeito à precisão do modelo, constata-se que é preciso apresentando um valor de precisão de 26,935, ou seja bastante superior aos 4 que corresponde ao valor mínimo desejável para considerar um modelo preciso.

Na figura seguinte encontra-se representada a superfície de resposta do modelo determinado para a produção de FOS por *Aspergillus* sp, onde se pode verificar a influência da temperatura e da agitação na produção dos FOS.

DESIGN-EXPERT Plot

Actual Factors:

X = Temperatura 0.739727

Y = Agitação

0.490306

0.240885

-0.00853633

0.257958

F_{0.05}

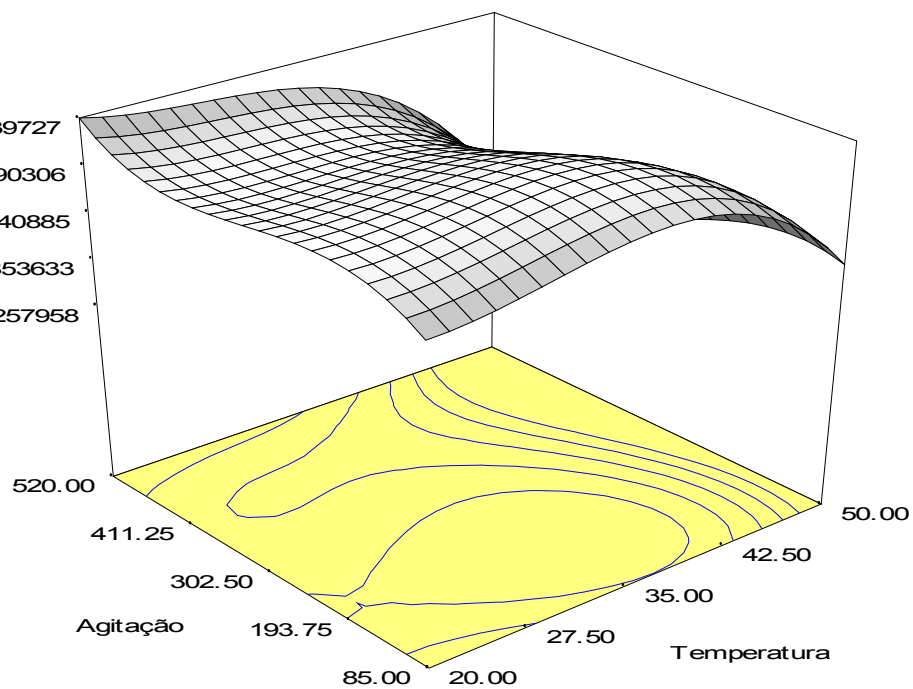


Figura 8 Superfície de resposta do modelo determinado para produção de FOS por *Aspergillus sp*

4.4. Fermentações no ponto óptimo

Os resultados obtidos nas fermentações efectuadas no ponto óptimo encontram-se representados na seguinte tabela.

Tabela 12 Resultados das fermentações efectuadas no ponto óptimo (tempo total de fermentação 96h)

Fermentação	Condições		Produção máxima FOS	Rendimento
	Temperatura / °C	Agitação / rpm	(g.L ⁻¹)	(g _{FOS} /g _{sacarose})
1	35,2	173,6	125,73	0,61
2	35,2	173,6	126,90	0,64
3	35,2	173,6	125,29	0,62

O rendimento da produção de FOS depende da concentração inicial de sacarose no meio de cultura, pelo que variações nesta concentração, mesmo que pequenas, terão sempre efeitos no rendimento final de FOS obtido. Dado que durante a realização destas fermentações houve pequenas variações da concentração inicial da sacarose no meio, a diferença entre os valores do rendimento previsto e obtido pode ser explicada por este factor. No entanto, mesmo assim a diferença observada é grande, pelo que a variação da concentração da sacarose não pode ser o único factor a influenciar o rendimento de produção dos FOS.

Teoricamente é possível obter um rendimento de produção de FOS a partir da sacarose, caso a questose seja o único FOS produzido, na ordem dos 75%. No entanto, o rendimento que normalmente é obtido nas fermentações com o objectivo de produzir FOS é consideravelmente mais baixo e apresenta valores próximos dos 60 % (Yoshikawa et al 2008), estando os rendimentos obtidos neste desenho experimental próximos desses valores.

A diferença entre os valores dos rendimentos obtidos e o previsto pelo modelo pode ser explicada pela formação e acumulação ao longo da fermentação de glucose e frutose, pois a formação destes inibe a produção dos FOS afectando assim o seu rendimento de produção.

Na figura seguinte pode-se observar que houve a produção de glucose e frutose durante a fermentação. Também é possível verificar que a questose não foi o único FOS produzido, o que comprova que o rendimento foi afectado pela formação de frutose e glucose e dos restantes FOS.

Da análise dos resultados das fermentações efectuadas no ponto óptimo do modelo, verifica-se que o rendimento de produção dos FOS varia entre os 0,61 e os 0,64 g_{FOS}/g_{sacarose}, ou seja inferior aos 0,703 g_{FOS}/g_{sacarose} teoricamente previsto.

Apesar do valor de rendimento previsto pelo modelo ser igual a 70,3 %, convém referir que, para um intervalo de confiança de 95 % se prevê que o rendimento do modelo varie num intervalo entre 60,37 e 80,41 %. Neste sentido, os valores obtidos estão abrangidos por este intervalo. Sendo assim,

pode-se considerar que este ponto corresponde ao óptimo de produção de FOS tendo-se validado o modelo.

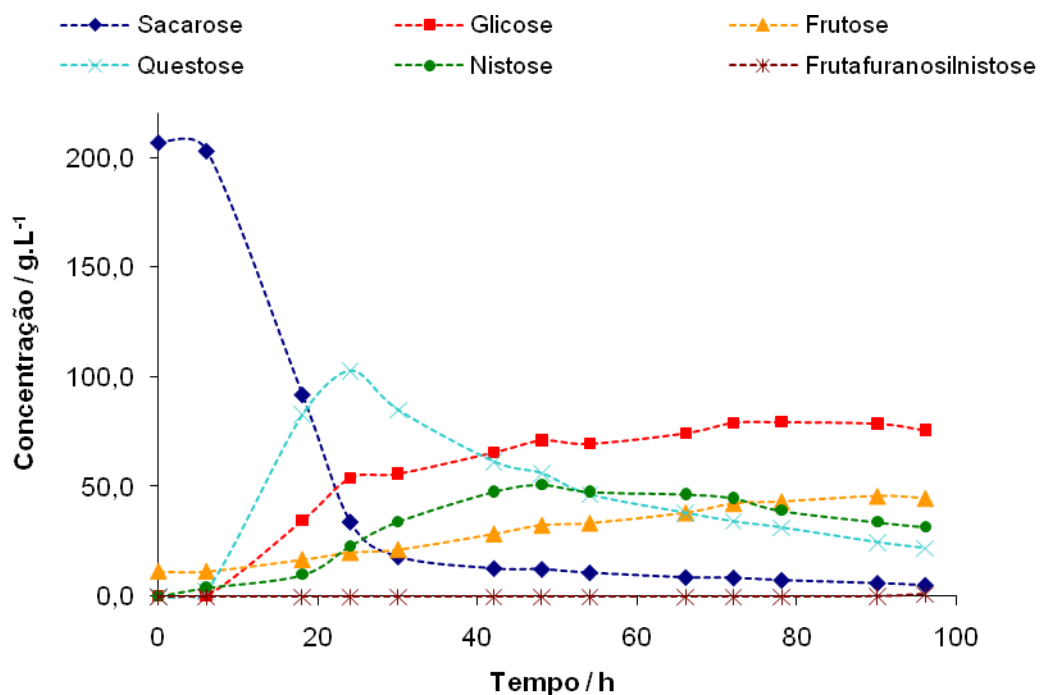


Figura 9 Evolução da concentração do substrato e produtos ao longo da fermentação (T = 35,2 °C e Agitação = 173,6 rpm)

5. Conclusões e Recomendações de Trabalho Futuro

Neste capítulo serão apresentadas as principais conclusões deste trabalho, e algumas recomendações para trabalhos futuros.

5.1. Conclusões

O objectivo desta tese foi otimizar a produção dos FOS por *Aspergillus* sp usando como ferramenta a optimização factorial de experiências. Uma das primeiras conclusões deste trabalho foi que o fungo *Aspergillus* Sp é um bom produtor dos FOS e pode constituir uma boa alternativa a outros reportados na literatura, tais como *Fusarium* sp, *Aureobasidium* sp, *A. niger* e *A. japonicus*.

Adicionalmente, conclui-se que a produção de FOS é sensível à variação da temperatura e da agitação, sendo que a variação da temperatura tem um maior impacto na produção de FOS por *Aspergillus* sp do que a variação da agitação.

Como resultado deste trabalho foi possível estabelecer um modelo que descreve a produção de FOS por *Aspergillus* sp é reprodutível e viável, deixando em aberto uma grande expectativa quanto à utilização deste microrganismo como produtor de FOS a uma escala industrial.

De acordo com este modelo foi possível estabelecer as condições experimentais que maximizam a produção de FOS por este fungo. Assim, usando uma temperatura de 35,2 °C e uma agitação de 173,6 rpm, foi possível obter um rendimento de produção de FOS total de [0,61;0,64] g_{FOS}/g_{sacarose}.

Finalmente, é de referir que o rendimento de produção de FOS por *Aspergillus* sp é muito afectado pela produção e acumulação de glucose e frutose ao longo da fermentação.

5.2. Recomendações

Naturalmente a realização deste trabalho deixa em aberto alguns pontos que poderão constituir recomendações para futuro trabalho. Nesse sentido, seria interessante fazer o scale-up deste processo para confirmar a sua rentabilidade e viabilidade. Adicionalmente, deverá investir-se algum esforço no desenvolvimento de estratégias de aproveitamento dos subprodutos do processo de produção de FOS, nomeadamente glucose e frutose. Ou em alternativa, o desenvolvimento de estratégias de remoção de glucose e frutose, por exemplo usando enzimas, aumentando desta forma os rendimentos finais de produção de FOS. Finalmente, poderá pensar-se na optimização de outros parâmetros de operação, tais como % de oxigénio dissolvido e pH.

6. Bibliografia

Cheng, C., Duan, K., Sheu, D., Lin, C., Li, S. *Production of Fructooligosaccharides by Immobilized Micelium of Aspergillus japonicas*. Journal of chemical technology and biotechnology, 66:135 – 138, 1996.

Chiang, C e Lee, W. Immobilization of β – Fructofuranosidases from *Aspergillus* on Methacrylamide – Based Polymeric Beads for Production of Fructooligosaccharides. Biotechnology, 13:577 – 582, 1997.

Chien, C., Lee, W., Lin, T. Immobilization of *Aspergillus japonicus* by Entrapping Cells in Gluten for Production of Fructooligosaccharides. Enzyme and microbial technology. 29:252 – 257, 2001.

Dias, L.G., Veloso, A.C.A., Correia, D.M., Rocha, O., Torres, D., Rocha, I., Rodrigues, L.R., Peres, A.M. UV spectrophotometric method for the monitoring of galacto-oligosaccharides production. Food Chemistry, 113:246 – 252, 2009.

Diplock, A.T., Aggett, P.J., Ashwell, M., Bornet, F., Fern, E.B., Roberfroid, M.b. Scientific concepts of functional foods in Europe: Consensus document. British journal of nutrition, 81 supp. 1S1-S28, 1999.

Fernández, R.C., Maresma, B.G., Juárez, A., Martínez, J. Production of Fructooligosaccharides by β – Fructofuranosidase from *Aspergillus* sp 27H. Journal of chemical technology and biotechnology, 79:268 – 272, 2004.

Ghazi, I., Fernández – Arrojo, L., Garcia – Arellano, H., Ferrer, M., Ballesteros, A., Plou, F.J., Purification and Kinetic Characterization of Fructosyltransferase from *Aspergillus aculeatus*. Journal of Biotechnology, 128:204 – 211, 2006.

Gibson, G.R., Beatty, E.R., Wang, X. Selective Stimulation of Bifidobacteria in the Human Colon by Oligofructose and Inulin. Gastroenterology, 108:975 – 982, 1995.

Gibson, G.R. e Williams, C.M. *Functional Foods*. Woodhead Publishig. England, 2000.

Hartemink, R., Vanlaere, K.M.J., Rombouts, F.M Growth of Enterobacteria on Fructooligosaccharides. Journal of Applied Microbiology, 383:367 – 374, 1997.

Huebner, J., Wehling, R.L., Parkhurst, A., Hutkins, R.W. Effect of Processing Conditions on the Prebiotic Activity of Commercial Prebiotics. International Dairy Journal, 18:287 – 293, 2007.

Lundstedt, T., Seifert, E., Abramo, L., Thelin, B., Nystrom, A., Pettersen, J., Bergman, R. Experimental design and optimization. Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems, 42:3 – 40, 1998.

Mandenius, C. e Brundin, A. Bioprocess optimization using design-of-experiments methodology. Biotechnology, 24:1191 – 1203, 2008.

Martínez, C.V. Alimentacion y Nutricion. In: Manual Teórico Prático. 2ª edição, Ediciones Díaz De Santos, S.A. México, 2005.

Neeser, J.R. e German, J.B. Bioprocesses and Biotechnology for Functional Foods and Nutraceuticals. Marcel Dekker Inc, New York, 2004.

Mussatto, S.I., Aguilar, C.N., Rodrigues, L.R., Teixeira, J.A. Fructooligosaccharides and β – fructofuranosidase production by *Aspergillus japonicas* immobilized on lignocellulosic materials. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 59:76 – 81, 2009.

Mussatto, S.I., Aguilar, C.N., Rodrigues, L.R., Teixeira, J.A. *Colonization of Aspergillus japonicus on synthetic materials and application to the production of Fructooligosaccharides*. *Carbohydrate Research*, 344:795 – 800, 2009.

Mussatto, S.I., Rodrigues, L.R., Teixeira, J.A. β – fructofuranosidase production by repeated bath fermentation with immobilized *Aspergillus japonicus*. *Journal of Industrial and Biotechnology*, 36:923 – 928, 2009.

Nguyen, Q.D., Rezessy – Szabó, J.M., Bhat, M.K., Hoschke, A., *Purification and Some Properties of β – Fructofuranosidase from Aspergillus niger* IMI303386. *Process Biochemistry*, 1 - 6, 2004.

Nishizawa, K., Nakajima, M., Nabetani, H. *Kinetic Study on Transfructosylation by β – Fructofuranosidase from Aspergillus niger* ATCC20611 and Availability of a Membrane Reactor for Fructooligosaccharides Production. *Food Science Technology*, 7:39 – 44, 2001.

Ouarne, F. e Guibert, A. *Fructooligosaccharides: Enzymic Synthesis from Sucrose*. *Zuckerindustrie*, 120:793 – 798, 1995.

Passos, L.M.L e Park, Y.K. Fructooligosaccharides: Implicações na Saúde Humana e Utilização em Alimentos. *Ciência Rural*, 33:385 – 390, 2003.

Pitt, J.I e Hocking, A.D. *Aspergillus and related teleomorphs*. In: *Fungi and Food Spoilage, second edition*. University Press Cambridge, London, Great Britain, 339 – 366, 1997.

Rossi, M., Corradini, C., Amaretti, A., Nicolini, M., Pompei, A., Zanoni, S., Matteuzzi, D. *Fermentation of Fructooligosaccharides and Inulin by Bifidobacteria: a Comparative Study of Pure and Fecal Cultures*. *Applied and Environmental Microbiology*, 71:6150 – 6158, 2005.

Sangeetha, P.T., Ramesh, M.N., Prapulla, S.G. *Fructooligosaccharides Production Using Fructosyl Transferase Obtained from Recycling Culture of Aspergillus oryzae* CFR202. *Process Biochemistry*, 40:1085 – 1088, 2005.

Sangeetha, P.T., Ramesh, M.N., Prapulla, S.G. *Maximization of Fructooligosaccharide Production by two Stage Continuous Process and its Scale up*. *Journal of Food Engineering*, 68:57 - 64, 2005.

Sangeetha, P.T., Ramesh, M.N., Prapulla, S.G. *Recent Trends in the Microbial Production, Analysis and Application of Fructooligosaccharides*. *Trends in Food Science and Technology*, 16:442 – 457, 2005.

Sheu, D., Duan, K., Cheng, C., Bi, J., Chen, J. *Continuous Production of High – Content Fructooligosaccharides by a Complex Cell System*. *Biotechnology*, 18:1282 – 1286, 2002.

Suskovic, J., Kos, B., Goreta, J., Matosic, S. Role of lactic acid bacteria and bifidobacteria in symbiotic effect food. *Food Technology and Biotechnology*, 39:227 – 235, 2001.

Valdivieso – Ugarte, M., Ronchel, C., Bañuelos, O., Velasco, J., Adrio, J.L. *Expression of an Aspergillus niger Glucose Oxidase in Saccharomyces cerevisiae and its Use to Optimize Fructooligosaccharides Synthesis*. *Biotechnology*, 22:1096 – 1101, 2006.

Wallis, G.L.F., Hemming, F.W., Peberdy, J.F. *Secretion of Two β – Fructofuranosidase by Aspergillus niger Growing in Sucrose*. *Archives Biochemistry and Biophysics*, 345:214 – 22, 1997.

Yoshikawa, J., Amachi, S., Shinoyama, H., Fujii, T. Production of fructooligosaccharides by crude enzyme preparation of β – fructofuranosidase from *Aureobasidium Pullulans*. *Biotechnology Lett*, 30:535 – 539, 2008.

Yun, J.W., Kim, D.H., Kim, B.W., Song, S.K. *Comparison of Sugar Compositions Between Inulo – and Fructooligosaccharides Produced by Different Enzyme Forms*. Biotechnology Letters, 19:553 – 556, 1997.

Anexos

A.1. Determinação da biomassa

Para a calibração da biomassa retirou-se uma amostra de 30 mL do meio fermentativo e fez-se quantificação de peso seco em triplicado, de acordo com o descrito nos materiais e métodos.

O peso seco foi calculado a partir da razão entre o peso da biomassa e o volume filtrado.

A.2. Curvas de calibração dos açúcares (HPLC)

Nas figuras seguintes encontram-se representadas as curvas de calibração dos açúcares, que foram posteriormente utilizados para calcular a concentração destes açúcares no meio fermentativo, bem como a determinação do rendimento de produção dos FOS.

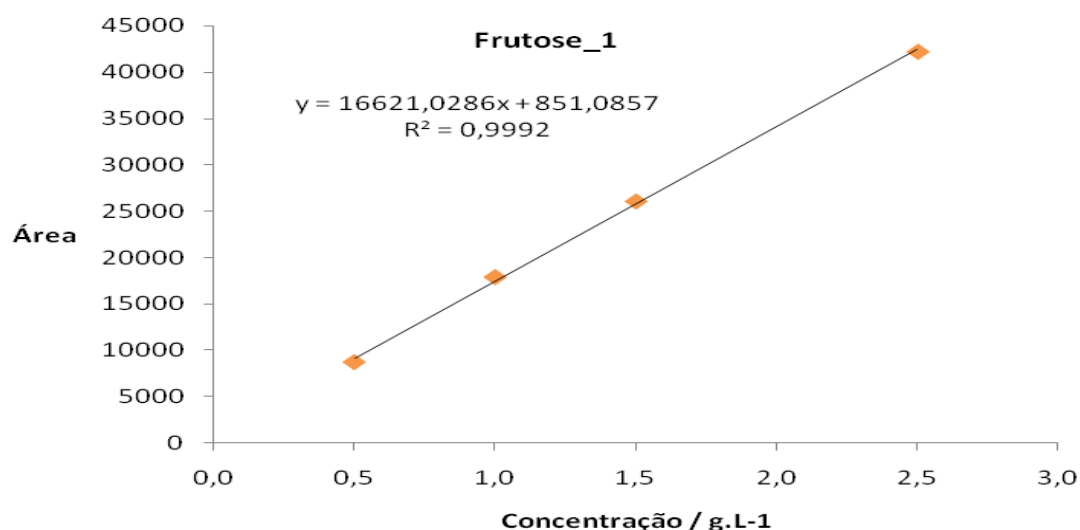


Figura 10 Curva de calibração da frutose_1

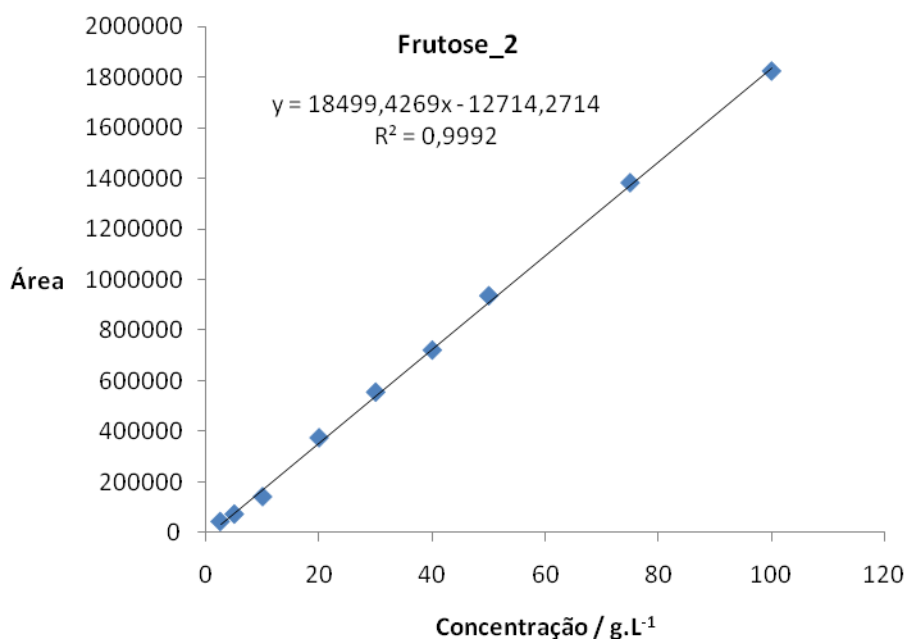


Figura 11 Curva de calibração da frutose_2

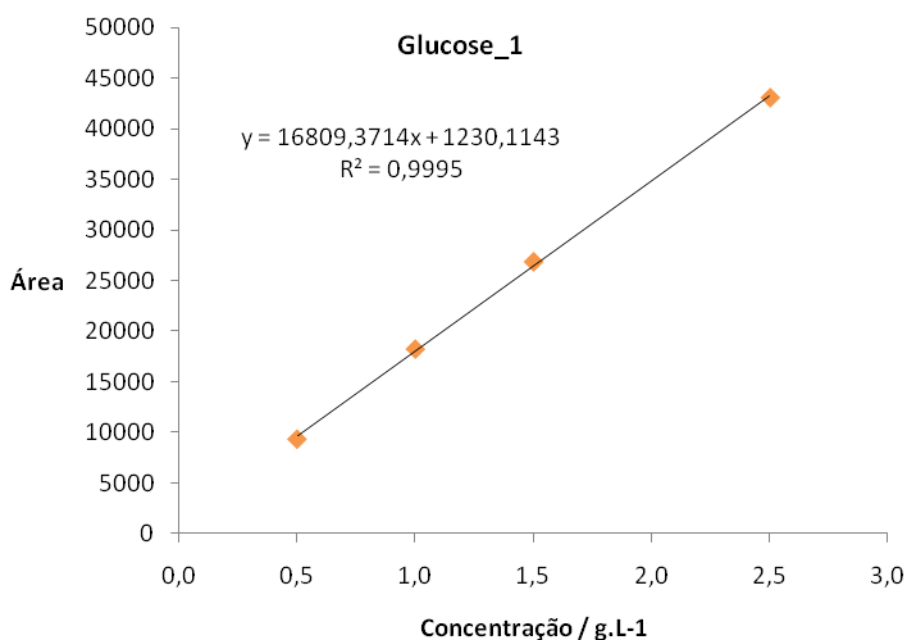


Figura 12 Curva de calibração da glucose_1

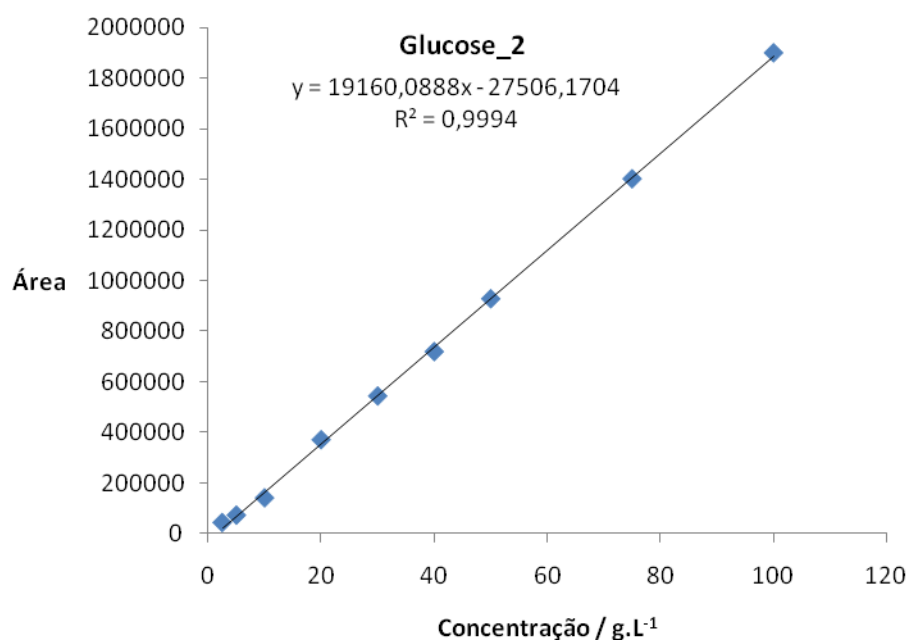


Figura 13 Curva de calibração da glucose_2

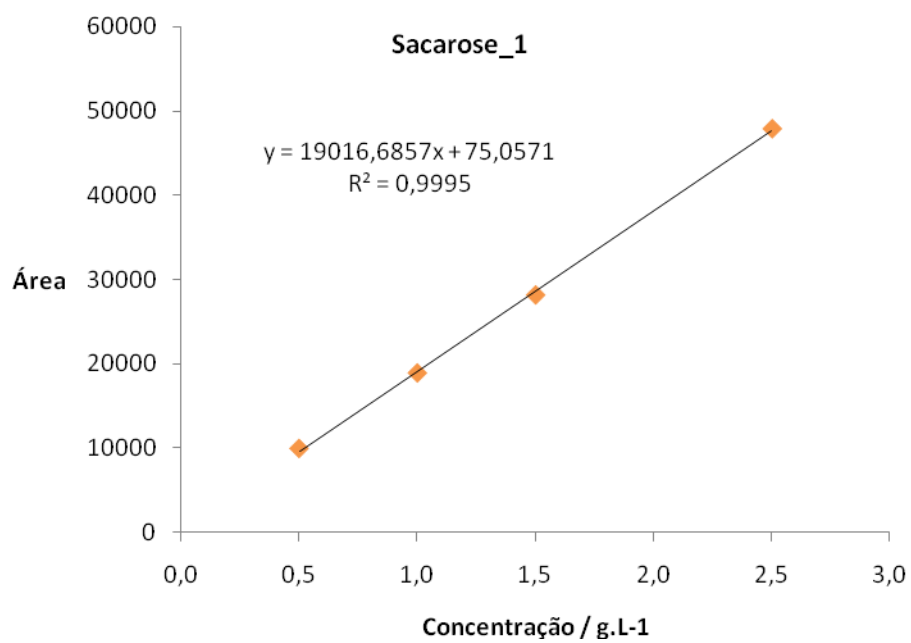


Figura 14 Curva de calibração da sacarose_1

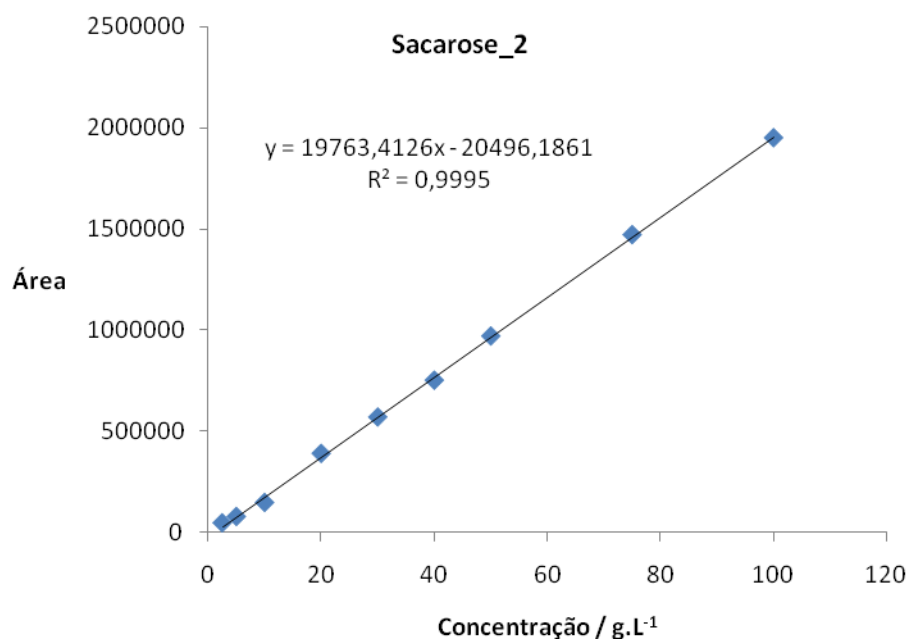


Figura 15 Curva de calibração da sacarose_2

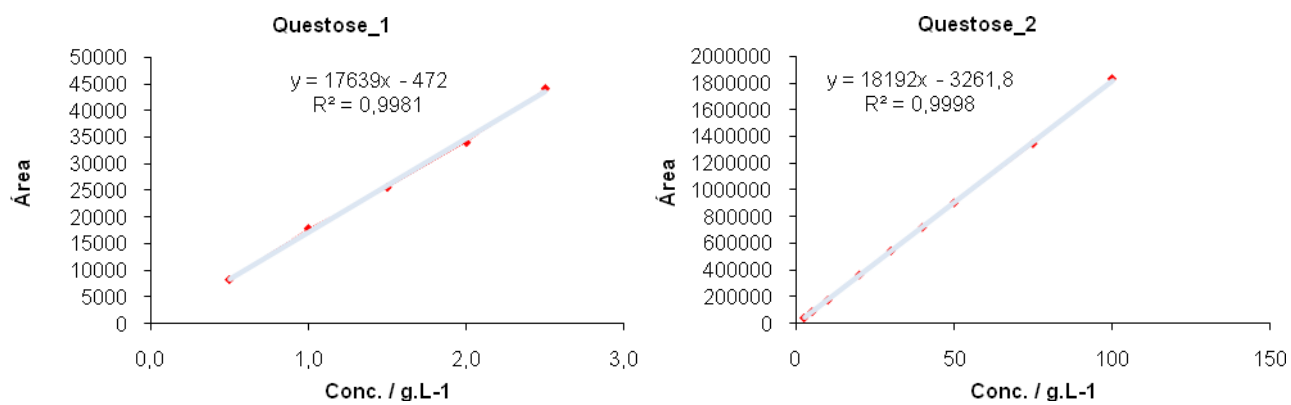


Figura 16 Curvas de calibração da questose

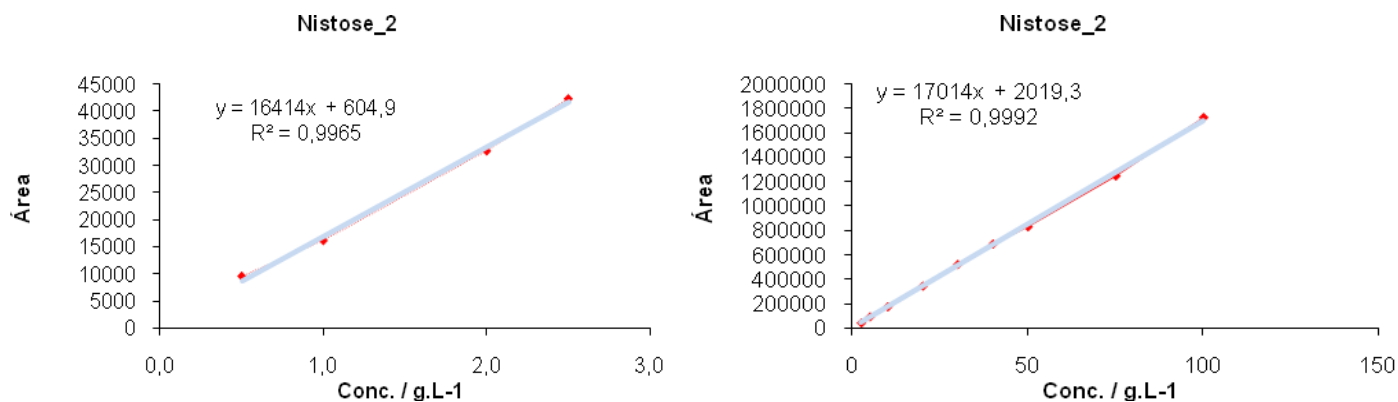


Figura 17 Curvas de calibração da nistose

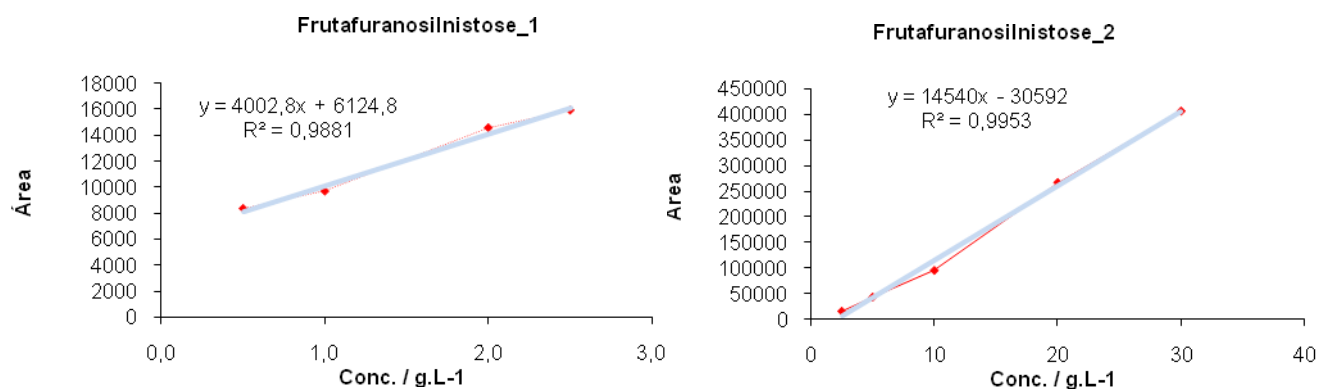


Figura 18 Curva de calibração da frutafuranosilnistose

A.3. Exemplo de um cromatograma

A seguir é apresentado um exemplo de um cromatograma resultante do HPLC. Foi através dos cromatogramas que se retiraram as áreas dos picos referentes a cada açúcar e, através das equações das curvas de calibração, se calcularam as respectivas concentrações e os rendimentos de produção dos FOS apresentadas nos resultados.

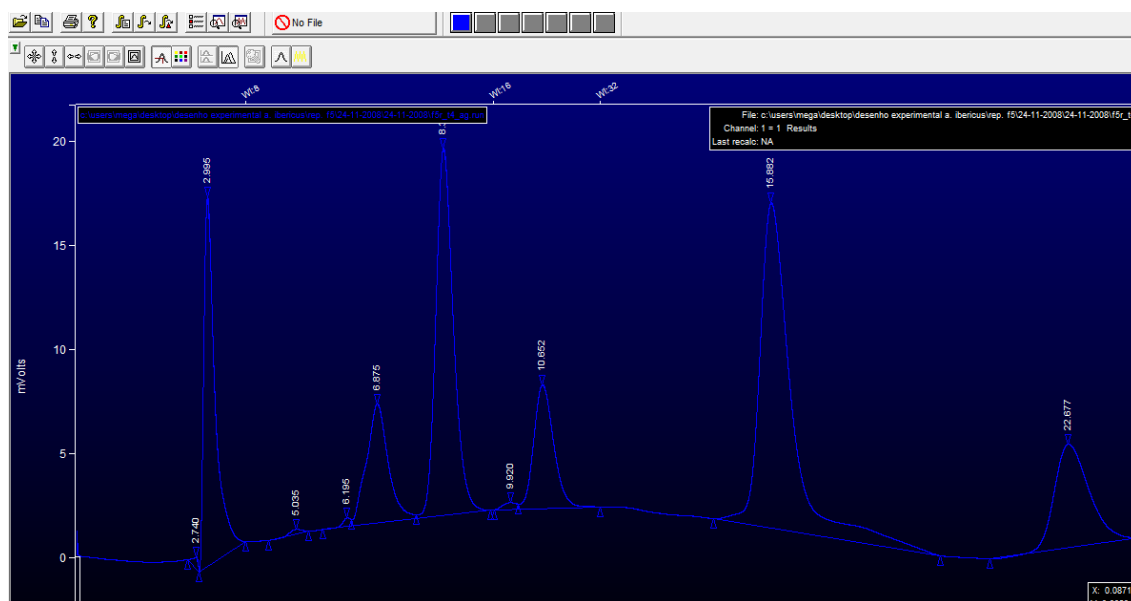


Figura 19 Exemplo de um cromatograma

